

**Oberflächenfunktionalisierte  
Polymerfasermatrices für den Einsatz im  
Tissue Engineering**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Dipl. Chem. Andreas Walz**  
aus Kaptschagai/Kasachstan

Marburg/Lahn, November 2009

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am ..... angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J.H. WENDORFF

Zweitgutachter: Dr. habil. S. AGARWAL

Tag der mündlichen Prüfung am 25.11.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Elektrospinnen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Einflussparameter.....	5
2.1.1.1	Parameter der Polymerlösung.....	5
2.1.1.2	Geräteparameter und Umgebungsbedingungen.....	6
2.1.2	Fasermorphologien.....	7
2.1.2.1	Poröse Fasern.....	8
2.1.2.2	Fasern mit Spindeln oder Tropfen.....	8
2.1.2.3	Bänderstrukturen.....	9
2.1.3	Faserdeposition.....	11
2.1.3.1	Orientierte Faservliese .....	11
2.1.3.2	Freitragende Faservliese.....	13
<b>2.2</b>	<b>Gewebezüchtung (<i>Tissue Engineering</i>).....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Einführung und Definition.....	14
2.2.2	Stamm- und Vorläuferzellen.....	18
2.2.2.1	Extrazelluläre Matrix.....	21
2.2.2.2	Zellmembran und Integrin-Rezeptoren.....	23
2.2.3	Gewebeaufbau und –bildung.....	26
2.2.3.1	Aufbau und Bildung des Knochengewebes.....	26
2.2.3.2	Aufbau der Netzhaut.....	30
2.2.3.2.1	Altersabhängige Makuladegeneration (AMD).....	33
2.2.3.2.2	Bisherige Transplantationsversuche zur AMD.....	36

<b>2.3</b>	<b>Elektrogesponnene Fasern im Tissue Engineering.....</b>	<b>37</b>
2.3.1	Oberflächenfunktionalisierte Fasern durch Plasmabehandlung.....	38
2.3.2	Protein- und Mineralfunktionalisierte Fasern nach Plasmabehandlung.....	42
2.3.3	RGD-Peptidfunktionalisierte Fasern im Tissue Engineering.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Oberflächenfunktionalisierte Fasermatrices für den Einsatz im Bone Tissue Engineering.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Motivation und Zielsetzung.....	47
3.1.2	Entwicklung einer Poly(L-lactid)matrix mit angereicherten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche für die <i>in vitro</i> Zellkultivierung.....	48
3.1.2.1	Systemwahl.....	49
3.1.2.1.1	Poly(L-lactid)matrixsystem.....	49
3.1.2.1.2	Lineare und zyklische RGD Peptide.....	50
3.1.2.2	Anreicherung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche.....	51
3.1.2.2.1	Untersuchungen zu Fasern aus PLLA/RGD-Emulsion.....	52
3.1.2.2.2	Untersuchungen zu Fasern aus PLLA/RGD-Suspension...	55
3.1.2.3	Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices mit angereicherten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche.....	58
3.1.3	Entwicklung einer RGD beschichteten Poly(L-lactid)matrix für die <i>in vitro</i> Zellkultivierung.....	65
3.1.3.1	Einfluss des Sauerstoffplasmas auf die Poly(L-lactid)oberfläche und die mechanischen Eigenschaften.....	66
3.1.3.1.1	Kontaktwinkelmessungen an glatten PLLA-Fasern.....	70
3.1.3.1.2	Rasterkraftuntersuchungen von plasmabehandelten PLLA-Filmen.....	74
3.1.3.1.3	Zug-Dehnungsmessungen an orientierten PLLA-Fasern...	78
3.1.3.1.4	Löslichkeitsstudien an plasmabehandelten PLLA-Fasern..	84



3.1.3.2 Immobilisierung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche.....	85
3.1.3.2.1 Immobilisierung von zyklischen RGD-Peptiden.....	85
3.1.3.2.2 Immobilisierung von Alexa 555 Hydrazid.....	86
3.1.3.2.3 Immobilisierung von FITC-RGD.....	87
3.1.3.2.4 Untersuchungen zur Kopplungsqualität.....	89
3.1.3.3 Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices mit immobilisierten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche.....	94
<b>3.1.4 Zusammenfassung zu den <i>Bone Tissue Engineering</i> Arbeiten.....</b>	<b>101</b>
<b>3.2 Elektrogesponnene Fasermatrices für die Kultivierung von Pigmentepithelzellen.....</b>	<b>102</b>
3.2.1 Motivation und Zielsetzung.....	102
3.2.2 Systemwahl und Testung der Kompatibilität von Pigmentepithelzellen....	102
3.2.2.1 Entwicklung einer freitragenden Polyamid(PA) 6-Matrix.....	103
3.2.2.2 Beschichtung mit PPX einer freitragenden PA 6-Matrix.....	103
3.2.2.3 SEM-Charakterisierung der Fasermatrices.....	104
3.2.2.4 Ergebnisse der ersten Matrixbesiedlungsversuche mit Pigmentepithelzellen auf Polyamid-6-Fasern.....	105
3.2.2.5 Ergebnisse der ersten <i>in vivo</i> Fasertransplantationen unter die Bindehaut eines Kaninchens.....	107
3.2.3 Entwicklung einer freitragenden Poly(L-lactid)matrix für die <i>in vitro</i> Zellkultivierung.....	109
3.2.3.1 Abhängigkeit der Fasermorphologie und des -durchmessers von der Polymerkonzentration.....	109
3.2.3.2 Matrixbesiedlungsversuche mit Bovinen Pigmentepithelzellen auf Poly(L-lactid)fasern.....	111
3.2.4 Zusammenfassung zu den Kultivierungsversuchen mit Pigmentepithelzellen.....	117

<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>118</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>120</b>
<b>5.1</b>	<b>Verwendete Chemikalien und Materialien.....</b>	<b>120</b>
<b>5.2</b>	<b>Präparation der Fasermatrices für das <i>Tissue Engineering</i>.....</b>	<b>121</b>
	5.2.1 Desinfektion der Elektrospinanlage.....	121
	5.2.2 Elektrospinnen der Faserproben auf Glasplättchen.....	122
	5.2.3 Elektrospinnen der Faserproben auf Aluringe.....	122
	5.2.4 Elektrospinnen der Faserproben auf eine rotierende Scheibe.....	123
	5.2.5 Elektrospinnen der verschiedenen Polymere.....	123
	5.2.6 PPX-Beschichtung durch Chemische Gasphasenabscheidung.....	124
<b>5.3</b>	<b>Anreicherung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche.....</b>	<b>125</b>
	5.3.1 Verspinnen von PLLA-RGD-Emulsionen.....	125
	5.3.2 Verspinnen von PLLA-RGD-Suspensionen.....	125
<b>5.4</b>	<b>Immobilisierung von Biomolekülen an der Faseroberfläche.....</b>	<b>126</b>
	5.4.1 Immobilisierung von Alexa 555 Hydrazid.....	126
	5.4.2 Immobilisierung von FITC-RGD.....	127
	5.4.3 Immobilisierung von zyklischen RGD-Peptiden.....	127
<b>5.5</b>	<b>Zellkulturen.....</b>	<b>128</b>
	5.5.1 Zellkulturen mit hMSC.....	128
	5.5.1.1 Präparation von Knochenspongiosa.....	128
	5.5.1.2 Passagieren / Trypsinisieren.....	129
	5.5.1.3 Analyse der Genexpression.....	131
	5.5.1.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	131

5.5.2 Zellkulturen mit Pigmentepithelzellen.....	132
5.5.2.1 Retinale Pigmentepithelzellen (RPE).....	132
5.5.2.2 Irispigmentepithelzellen (IPE).....	134
<b>5.6 Verwendete Geräte.....</b>	<b>135</b>
5.6.1 Optische Mikroskopie.....	135
5.6.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	135
5.6.3 Fluoreszenzmikroskop.....	135
5.6.4 Konfokales Fluoreszenzmikroskop.....	136
5.6.5 Rasterkraftmikroskop.....	136
5.6.6 Zug-Dehnungs-Messungen.....	136
5.6.7 Kontaktwinkelmessungen.....	136
5.6.8 Plasmagenerator.....	137
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>148</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.2 Veröffentlichungen, Tagungen und Messeteilnahmen.....	149
7.2.1 Veröffentlichungen.....	149
7.2.2 Tagungsteilnahmen.....	150
7.2.3 Messeteilnahmen.....	151
7.2.4 Erwähnungen.....	151
7.3 Eidesstattliche Erklärung.....	152
7.4 Danksagung.....	153

# 1. Einleitung

In der regenerativen Medizin wird das „Tissue Engineering“ genutzt, um funktionsuntaugliches oder zerstörtes Gewebe zu ersetzen oder natürliche Heilungsprozesse zu fördern. Unter „Tissue Engineering“ versteht man die Züchtung von vitalen Organgeweben unter Laborbedingungen. Unterschiedliche Zelltypen können dabei auf einem strukturellen Gerüst kultiviert werden. Das Wachstum dieser Zellen ist dabei stark von der Oberflächenbeschaffenheit dieser strukturellen Gerüste abhängig. Zusätzlich kann das Wachstum der Zellen durch sogenannte Wachstumsfaktoren kontrolliert und stimuliert werden. Das Ziel der aktuellen Forschungsbemühungen weltweit ist es, komplexe Gewebe und sogar ganze Organe zu züchten, um den weltweiten Bedarf an Organen und Geweben zu decken. So wird versucht, abgenutzten Knorpel, beschädigte Haut- und Knochengewebe nachzuzüchten und zu ersetzen. Seit Jahren wird diese Technologie erfolgreich auch bei der Knorpelzelltransplantation verwendet<sup>[1-3]</sup>.

Besonders wichtig sind die Lebensdauer, die Haltbarkeit und die Verträglichkeit dieser neuen Implantate: es gilt optimale und gut verträgliche Ersatzmaterialien zu finden. Hier bieten sich elektrogesponnene Polymerfasern an, deren Faserdurchmesser nur einige Nanometer bis Mikrometer betragen<sup>[4]</sup>. Polymerfasern bilden die Extrazelluläre Matrix einer Zelle nach und gewährleisten ein gutes Zellwachstum auf diesem strukturellen Gerüst. Polymerfaservliese bieten dem Zellwachstum ausreichend freien Raum für den Stoffwechsel und die Sauerstoffversorgung. Eine hohe Porosität von Polymerfaservliesen fördert das Zellwachstum. Ganz entscheidend ist jedoch die Oberfläche von Polymerfasern. Die Oberfläche-Zellwechselwirkung ist z.B von der Toxizität, der Benetzbarkeit, der Rauigkeit, der Oberflächenladung und der Biokompatibilität abhängig<sup>[5-6]</sup>.

In dieser Arbeit stehen Polymerfasern mit selektiver strukturierter Oberflächenbeschaffenheit im Mittelpunkt. Speziell soll die Biokompatibilität der Faseroberfläche gezielt verbessert werden. Bekannte Verfahren zur Oberflächenmodifikation von Fasern sind das Co-Elektrospinnen und das TUFT-Verfahren (tubes by fiber templates)<sup>[7]</sup>. Bei beiden Verfahren werden Fasern mit Kern-Schale-Struktur erhalten. Beim Co-Elektrospinnen kann die Schale und der Kern der Polymerfaser weitgehend unabhängig voneinander aufgebaut werden<sup>[4]</sup>. Dabei kann die Schale z.B aus Polymeren oder Proteinen bestehen, um eine gezielte Einstellung der Oberfläche einer Faser zu ermöglichen. Dieses Verfahren stößt jedoch schnell an seine Grenzen, da nur bestimmte Polymere oder Polymer/Proteinmischungen zu Fasern

verarbeitet werden können. Bei dem TUFT-Verfahren wird die Beschichtung der Faseroberfläche erst nach der Fasererzeugung durchgeführt. Dabei wird über Gasphasenabscheidung z.B. mit Poly(*p*-xylylen) auf die Faseroberfläche eine Polymerschicht aufgebracht. Auch hier ist die Limitierung sehr stark, da nur Polymere abgeschieden werden können, die als Monomere in die Gasphase gebracht werden können<sup>[7]</sup>.

In der Arbeit von R. DERSCH<sup>[8]</sup> wird darauf hingewiesen, dass eine gewünschte Funktionalisierung der Faseroberfläche z.B. durch eine gezielte Anbindung von Wirkmolekülen erreicht werden kann. Eine Immobilisierung von Katalysatoren auf der Faseroberfläche wurde z.B. von M. STASIAK<sup>[9]</sup> durchgeführt, um bestimmte Reaktionen zu katalysieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, biokompatible, strukturierte und funktionalisierte Matrices auf Basis der Polymernanofasern herzustellen. Dazu sollen spezifische Peptide an der Faseroberfläche angereichert werden, um die Biokompatibilität zu erhöhen. Hierzu können Adhäsionspeptide mit Zellerkennungssequenzen, wie z.B. einer RGD-Sequenz an der Polymerfaseroberfläche angebunden werden, um so die Faseroberfläche-Zellwechselwirkung zu verstärken. In einer Kooperation mit Prof. Fuchs-Winkelmann vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg sollen Zellkultivierungsversuche auf diesen oberflächenfunktionalisierten Polymerfasermatrices durchgeführt werden. Speziell soll dabei das Zelladhäsions-, das Proliferations- und das Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen untersucht werden. Das Zielgewebe soll hier das Knochengewebe sein.

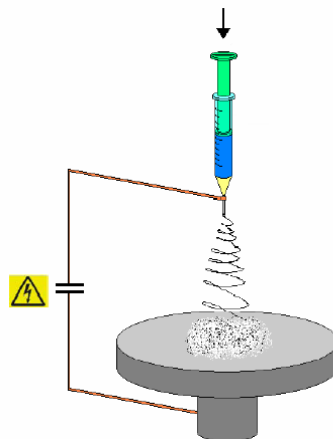
In einer weiteren Kooperation mit Prof. Thumann von der Augenklinik Aachen sollen „freitragende“ Polymerfasermatrices generiert werden. Diese Matrices sollen anschließend mit Retinalen Epithelzellen (RPE) und Irisepithelzellen (IPE) kultiviert werden, um eine transplantierbare Netzhaut zu erhalten. Gerade für Patienten, die an einer Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) erblinden, bietet dieser Therapieansatz die Hoffnung, die Fähigkeit des Sehens wieder zu erlangen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Elektrospinnen

Das Verfahren des Elektrospinnens bietet die Möglichkeit zur Erzeugung ultradünner Fasern. Durch eine Hochspannung von mehreren Kilovolt lassen sich Faserdurchmesser von einigen wenigen Nanometern erzielen<sup>[10]</sup>. Das Verfahren des Elektrospinnens wurde bereits 1929 von Formhals patentiert<sup>[11]</sup>, doch blieben die Möglichkeiten lange ungenutzt. Erst in den letzten Jahren bedingt durch den Trend zur Miniaturisierung von Funktionseinheiten, z.B. in der Medizin und Mikroelektronik und das Bestreben, immer stärker in den Nanobereich vorzudringen, gewann das Elektrospinnen stark an Bedeutung.

Die Abbildung 2.1 zeigt den schematischen Aufbau einer Apparatur zum Elektrospinnen. Durch eine Metallkanüle mit einem definierten Durchmesser wird eine Polymerlösung z.B. durch eine Hydraulikpumpe gepresst. Wird Hochspannung angelegt, tritt aus der Kanüle ein dünner Strahl aus, der sich auf der Gegenelektrode (Metallkollektor) ablegt.



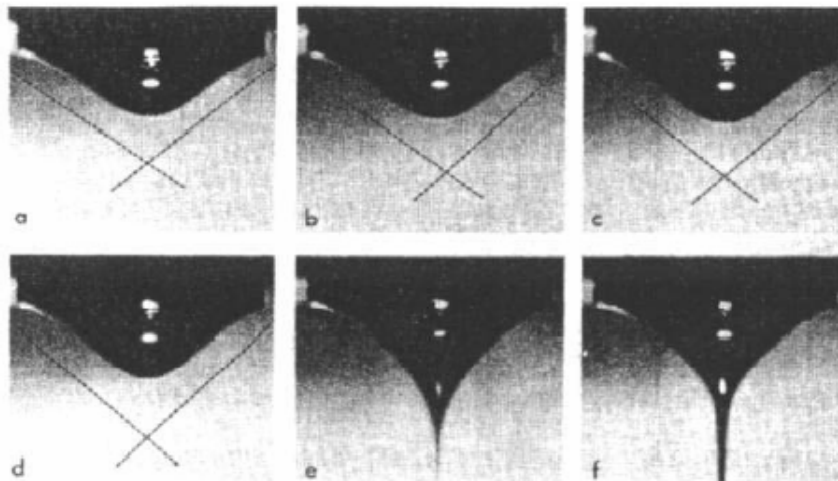
**Abbildung 2.1:** Schematischer Aufbau einer Apparatur zum Elektrospinnen<sup>[12]</sup>

An der Kanülenöffnung zeigt die Polymerlösung infolge von Schwerkraft und Oberflächenspannung einen Meniskus (Abbildung 2.2). Wird nun eine Spannung an den Meniskus angelegt, so werden in der Lösung Ladungen induziert. Während sich im Innern der Polymerlösung die Ladungen kompensieren, kommt es an der Oberfläche durch die

gegenseitige Abstoßung der Ladungen zu einer Verringerung der effektiven Oberflächenspannung. Der ursprüngliche Meniskus erfährt eine Deformation zum sogenannten *Taylor-Konus*<sup>[13-16]</sup>.

Ab einer gewissen Grenzspannung wird die Oberflächenspannung durch die wirksamen elektrostatischen Kräfte überkompensiert und es bildet sich wie in der Abbildung 2.2 zu sehen ein Strahl aus der Polymerlösung, der sich noch vor Erreichen der Gegenelektrode durch Verdampfen des Lösungsmittels verfestigt.

Taylor fand heraus, dass sich der Strahl aus Polymerlösung gerade dann bildet, wenn der halbvertikale Kegelwinkel des *Taylor-Konus* einen Wert von  $\varphi = 49,3^\circ$  annimmt<sup>[13]</sup>. Experimentell wurde ein Wert von etwa  $\varphi = 50^\circ$  für Newtonsche Flüssigkeiten festgestellt.



**Abbildung 2.2:** Bildung des Taylorkonus einer 16%igen Polyethylen/Paraffinöl-Lösung bei zunehmender Feldstärke<sup>[15]</sup>

Ein weiteres Phänomen tritt beim gebildeten Jet selbst auf. Gleiche Ladungen führen zur gegenseitigen Abstoßung und zur Instabilität des Jets. Es kommt zu einer so genannten *bending instability*. Die Ladungen versuchen einen größtmöglichen Abstand zueinander zu erreichen, und der Jet selbst beginnt sich zu biegen und zu strecken und verliert auf diese Weise seine Geradlinigkeit<sup>[17-18]</sup>.

### 2.1.1 Einflussparameter

Es gibt eine Vielzahl von Parametern, die einen Einfluss auf den Elektrospinnprozess nehmen können. Dadurch können die Fasergenerierung und Fasermorphologie modifiziert werden. Neben den Geräteparametern und Umgebungsbedingungen hat die zu verspinnende Polymerlösung den entscheidenden Einfluss.

#### 2.1.1.1 Parameter der Polymerlösung

Bei einigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Dicke von Polymerfasern proportional zum Quadrat der Polymerkonzentration ist<sup>[19]</sup>. Die Polymerlösungen lassen sich nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich verspinnen. Ist die Viskosität der Polymerlösung zu niedrig, werden Tröpfchen in dem sogenannten Elektro spraying gebildet. Ist die Viskosität zu hoch, hat das elektrische Feld keinen ausreichenden Einfluss auf das Material. Die Verspinnbarkeit der Lösung ist von den speziellen Eigenschaften der Lösung selbst abhängig. Es sind unter anderem die schon genannte Viskosität der Lösung, ferner die Leitfähigkeit und Oberflächenspannung. Es wurde beobachtet, dass der Zusatz von Additiven wie Pyridiniumformiat zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit einer Polymerlösung führt<sup>[20-21]</sup>. Dadurch werden die Polymerketten stärker verstreckt, was zur Verringerung des Faserdurchmessers führt. Die Eigenschaften des gelösten Polymers, wie die chemische Zusammensetzung und das Molekulargewicht spielen eine grosse Rolle. Wenn das Molekulargewicht und die Viskosität des Polymers ausreichend hoch sind, reißt der aus dem *Taylor-Konus* gebildete Strahl nicht mehr ab. Es kommt zur Verflechtung (*Entanglement*) der Polymerketten, die zur Ausbildung der Polymerfaser führt<sup>[22]</sup>.



### 2.1.1.2 Geräteparameter und Umgebungsbedingungen

Äußere Einflüsse auf den Elektrosinnvorgang sind die Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und der Luftdruck. Außerdem sind Spinnparameter, wie die angelegte Hochspannung, der Kanüldurchmesser, der Abstand zwischen Kanüle und Gegenelektrode, das Substrat und die Flussrate der Polymerlösung entscheidend.

Die Luftfeuchtigkeit beeinflusst die Verdunstungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels, was auf die Stabilität des Spinnvorgangs Einfluss hat. Eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit führt dazu, dass während der Verdunstung eines leichtflüchtigen Lösungsmittels sich Wassertropfen auf der sich abkühlenden Polymeroberfläche kondensieren. Die Bildung von porösen Fasern wird im Kapitel 2.1.2.1 ausführlicher dargestellt.

Für jedes Polymer-Lösungsmittel-System gibt es eine Mindestspannung, die angelegt werden muss, damit sich ein stabiler Taylor-Konus bildet. Nimmt die Durchflussrate zu, so muss auch die notwendige Spannung erhöht werden, damit sich ein stabiler Spinnvorgang fortsetzen kann. Bleibt die Spannung bei höherer Flussrate gleich, so ist eine Zunahme der Verdickungen in den Fasern zu beobachten. Bei noch höheren Flussraten bilden sich Spindeln und Tropfen entlang der Faser. Wird die Spannung zu hoch gewählt, so können vereinzelt Multijets beobachtet werden. Außerdem wird mehr Polymerlösung versponnen als nachgeführt werden kann. Dadurch wird der Spinnprozess instabiler. Bei höherer Spannung kommt es zusätzlich zu einer stärkeren Verstreckung der Polymerketten, so dass dünnere Fasern gebildet werden können.

Durch die Veränderung des Abstands zwischen der Kanüle und der Gegenelektrode kann auf die Verstreckung der Polymerketten und auf die Verdunstungszeit des Jets Einfluss genommen werden. Wird ein zu kleiner Abstand gewählt, kann das Lösungsmittel nicht vollständig verdunsten, was zu einer Verklebung und Verfilmung der Fasern führt.

Durch die unterschiedlichen Geometrien des Substrates wird Einfluss auf die Deposition der Faser genommen. Durch die Wahl des richtigen Substrates können Fasern, beispielsweise gezielt orientiert werden. Im Abschnitt 2.1.3 wird ausführlich erläutert, wie man freitragende und orientierte Faservliese herstellen kann.

### 2.1.2 Fasermorphologien

Anhand vieler einzelner Spinnparameter können die gewünschten Fasermorphologien und der Faserdurchmesser eingestellt werden. So ist es möglich, poröse Fasern und Fasern mit regelmäßigen Spindeln oder Tropfen herzustellen. Weiterhin sind auch Bandstrukturen und Verzweigungen an den Fasern bekannt.

#### 2.1.2.1 Poröse Fasern

Poröse Fasern können durch das Elektrospinnen von Polymerlösungen bei geeigneten experimentellen Bedingungen erhalten werden. Der exakte Mechanismus der Porenbildung ist jedoch sehr komplex. Zwei Theorien versuchen die Bildung der Poren bei den elektrogesponnenen Fasern zu erklären. Die Theorie der *breath figures*<sup>[23-24]</sup> erklärt die Bildung von Poren durch das schnelle Verdampfen des Lösungsmittels beim Spinnprozess und die damit resultierende Abkühlung der Jetoberfläche. Wie in der Abbildung 2.3 schematisch dargestellt, kondensiert das Wasser aus der Luft in kleinen Tröpfchen an der sich abkühlenden Faseroberfläche. Wenn die Faser nun trocknet, lassen die Wassertropfen praktisch ihren Abdruck auf der Faseroberfläche zurück. Wiederholt sich der Vorgang, bilden sich tiefere Poren, denn die Abdrücke wirken als Template für neue Wassertropfen.

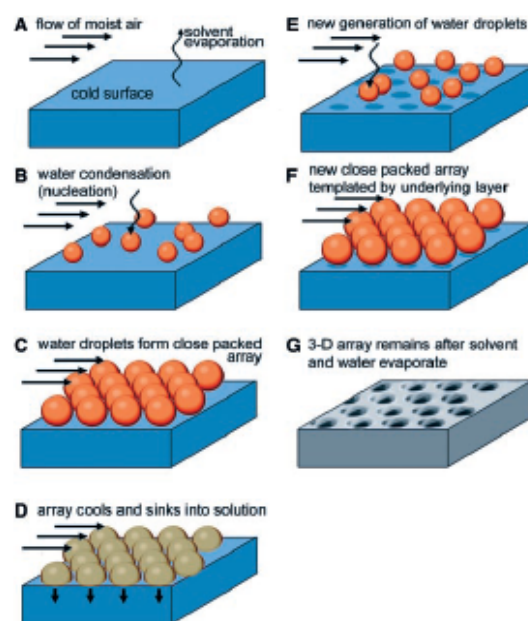


Abbildung 2.3: Bildung eines porösen Films durch *breath figures*<sup>[25]</sup>

In der Abbildung 2.3 wurden poröse Filme aus Polystyrol durch einen konstanten Luftstrom, der über die Filmoberfläche geleitet wurde, erhalten<sup>[25]</sup>. Durch das schnelle Verdampfen eines leichtflüchtigen Lösungsmittels kühlt sich die Oberfläche schnell ab. Es bildeten sich hexagonal angeordnete Poren. Die Poren auf der Oberfläche bei den elektrogewebten Fasern sind jedoch ungeordnet und zeigen unterschiedliche Formen<sup>[26]</sup>. Erklären lässt es sich mit der *bending instability*, wo es zum starken Verstrecken des Jets beim Elektrosponnen kommt. Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit wird als Hinweis für die Theorie der *breath figures* gewertet. Eine immer höhere Luftfeuchtigkeit führt zu immer grösserer Anzahl von Poren und Porenformen, zu grösseren Porendurchmessern und Verteilung der Porengrösse<sup>[26]</sup>. Auch die Variation des Molekulargewichts hat einen Einfluss auf die Porengrösse<sup>[26]</sup>. Mit einem höheren Molekulargewicht werden die Poren grösser und die Formverteilung der Poren nimmt zu. Die Theorie der *breath figures* alleine kann dieses Phänomen nicht erklären. Es ist eine weitere Beschreibung zur Porenbildung notwendig.

Die zweite Theorie beschreibt Phasenseparationsprozesse. Dabei findet eine Entmischung in Regionen höherer und niedriger Konzentrationen statt. Es kommt daher zur Porenbildung. Es soll an dieser Stelle nicht weiter auf Phasenseparationsprozesse eingegangen werden, da diese in dieser Arbeit eine eher untergeordnete Rolle spielen.

### 2.1.2.2 Fasern mit Spindeln oder Tropfen

Fasern mit Spindeln oder Tropfen (Beads) bilden sich bei auftretender Instabilität der Polymerlösung. Zur Instabilität der Polymerlösung tragen drei einzelne Beiträge oder Moden bei<sup>[17, 27-28]</sup>. Die *Rayleigh-Instabilität* wird durch eine hohe Oberflächenspannung der Polymerlösung verursacht. Mit steigender Oberflächenspannung wird die Polymerlösung instabiler und es bilden sich mehr Beads. Aus der hohen Oberflächenspannung resultiert das Bestreben zur Verringerung des Verhältnisses von Fläche zu Volumen. Bei einem sphärischen Tropfen ist das Verhältnis von Fläche zu Volumen minimal, dieser ist deshalb als Geometrieform in einer Faser bevorzugt. Viskoelastische Effekte der Polymerlösung verringern dagegen die Bildung von Beads<sup>[29]</sup>. Je höher die Viskosität einer Polymerlösung, desto weniger Beads werden gebildet.

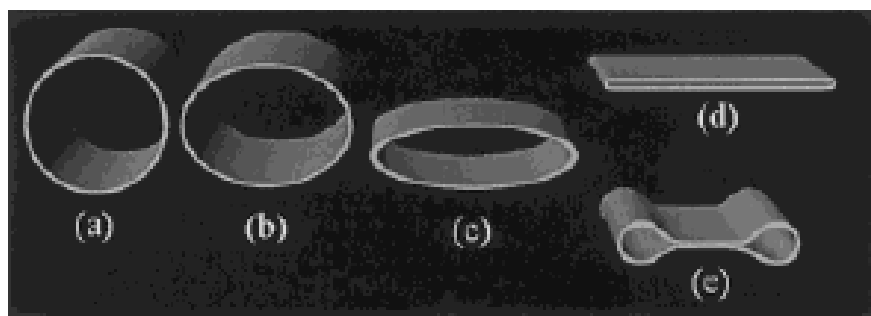
Die *conducting modes* haben dagegen einen elektronisch bedingten Einfluss auf die Faserstruktur. Bei einer hohen angelegten Spannung steigt der Einfluss des *whipping mode*.

Ein hohes elektrisches Feld führt zu einer Erhöhung der Ladungsdichte auf der Oberfläche, dadurch steigt die Abstoßung zwischen den Ladungen, was zu einer höheren Zugspannung auf den Jet führt. Die Beads werden daher kleiner und verschwinden schließlich ganz<sup>[30]</sup>. Weiter führen Polymerlösungen mit hoher Leitfähigkeit und einer künstlich erhöhten Leitfähigkeit durch Salzzugabe zu weniger Beads und glatten Fasern<sup>[29-31]</sup>.

Auch die experimentellen Bedingungen zum Elektrospinnen können einen Einfluss auf die Bildung von Beads ausüben. Bei einem grossen Elektrodenabstand können mehr Beads in der Faser erhalten werden<sup>[30]</sup>. Durch die größere Strecke beim Spinnprozess ist die Zeit zur Bildung von Beads viel größer. Eine höhere Flussrate führt zur Bildung von größeren Beads<sup>[30]</sup>. Mit mehr Lösung muss auch viel mehr verstreckt werden und die angelegte Spannung reicht nicht aus. Die überschüssige Lösung führt zur Bildung von Beads. Dieses Verhalten kann wieder auf die Oberflächenspannung zurückgeführt werden.

### 2.1.2.3 Bänderstrukturen

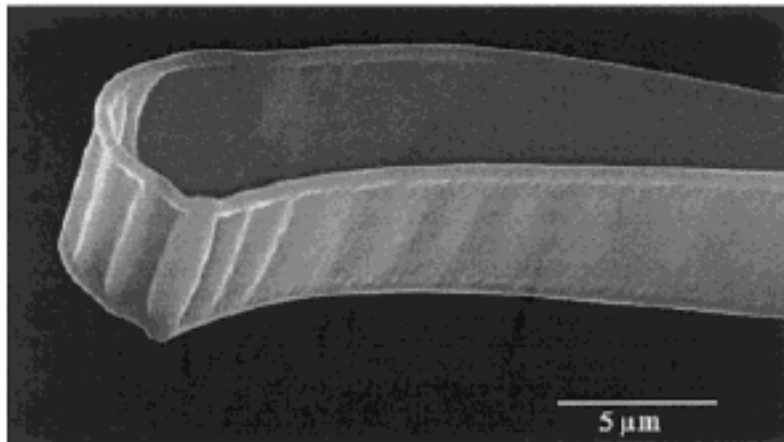
Zusätzlich zu den bekannten Fasern mit ihrem kreisrunden Querschnitt gibt es weiterhin Fasern mit vielfältigen Querschnittsgeometrien. So wurden in den Arbeiten von KOOMBHONGSE et al<sup>[32]</sup> Bänderstrukturen und Fasern mit Verzweigungen beobachtet. Bei den Untersuchungen verschiedener Polymer-Lösungsmittel-Systeme wurde die Entstehung dieser Strukturen als mechanischer Effekt von einer Flüssigkeit im Zusammenspiel der elektrischen Ladung des Jets und der Verdunstung des Lösungsmittels beschrieben.



**Abbildung 2.4:** Bildung eines Faserbandes aus einer Faser mit kreisrundem Querschnitt<sup>[32]</sup>

Es bildet sich eine dünne Polymerhaut auf der Oberfläche des Jets und das Lösungsmittel verdunstet schnell im Inneren der Faser. Die röhrenartige Polymerhaut fällt dabei durch den

Atmosphärendruck und Kohäsionskräfte zu einer Bandstruktur zusammen und es bilden sich bandähnliche Fasern. In der Abbildung 2.4 kann man sehen, dass der zunächst kreisrunde Faserquerschnitt ellipsenförmig und dann immer flacher wird bis der ellipsenförmige Faserquerschnitt komplett zusammenfällt. Alternativ kann der ellipsenförmige Faserquerschnitt so zusammenfallen, dass sich in der Mitte ein Band und außen zwei Röhren bilden (Abbildung 2.4(e)). Ob das Band flach ist oder Verdickungen an den Seiten aufweist (Abbildung 2.5), hängt stark mit der Steifigkeit der zuvor gebildeten Haut auf der Jetoberfläche zusammen. Wenn die Außenwand des Jets steif ist, so bilden sich reine Bandstrukturen ohne Verdickungen an den Seiten. Eine weitere Verstreckung des Faserquerschnitts wird auch durch eine hohe Ladung der Polymeroberfläche gefördert, so dass gar keine Röhren an den Seiten des Bandes gebildet werden können.



**Abbildung 2.5:** Faltiges Faserband gebildet aus einer 10% Poly(ether imid)-Lösung  
(Lösungsmittel: Hexafluoro-2-propanol)<sup>[32]</sup>

Im Abschnitt 3.1.2.2.1 wird das Verspinnen von Polymeremulsionen aus einer wässrigen und organischen Phase beschrieben. Dabei wurde ein alternativer Bildungsweg von Bändern beobachtet.

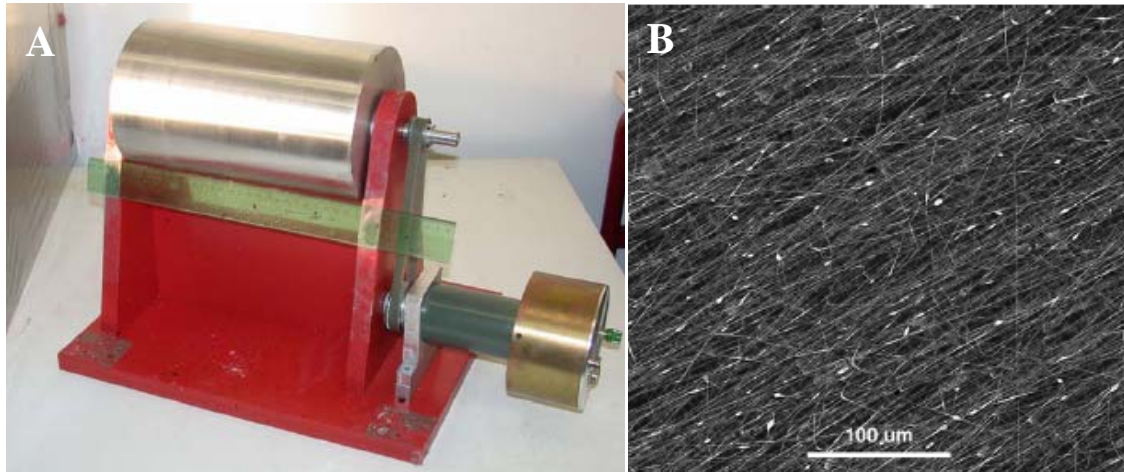
### 2.1.3 Faserdeposition

Bei dem Elektrospinnverfahren werden die Fasern unorientiert und planar auf dem Substrat abgelegt. Die Geschwindigkeit der Faserdeposition beträgt dabei einige Meter pro Sekunde<sup>[33]</sup>. Beim Standardversuchsaufbau wird eine runde Platte mit einer größeren Fläche als Gegenelektrode verwendet. Diese runde Platte kann dabei mit Aluminiumfolie umspannt werden, so dass die Fasern auf dieser Folie als eine unorientierte Fasermatte erhalten werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Fasern auf unterschiedliche Träger, wie Glasplättchen, Siliziumwafer und Objektträger abzulegen. Das gemeinsame Merkmal dieses Versuchsaufbaus ist eine unorientierte Fasermatte mit nur einer freien Oberseite des Faservlieses. An der Unterseite der Fasermatte befindet sich das Substrat, welches erst entfernt werden muss, wenn beide Seiten der Fasermatten zur Verfügung stehen sollen. Besonders die ersten abgelegten Fasern haften an dem Substrat. Beim Ablösen dünnerer Faservliese vom Substrat verliert das Faservlies die flache ebene Form und kollabiert. Neben der Erzeugung gewünschter Fasermorphologien ist es bei vielen Anwendungen notwendig eine gezielte Faserdeposition zu erhalten. So kann die Vorzugsrichtung der Fasern durch ein bestimmtes Substrat kontrolliert werden. Durch bestimmte Geometrien der Gegenelektrode können sogar unorientierte und orientierte freitragende Faservliese erhalten werden.

#### 2.1.3.1 Orientierte Faservliese

Eine Faserorientierung kann durch eine gezielte Veränderung der Gegenelektrode erreicht werden. Als Gegenelektrode kann eine rotierende Rolle, Scheibe oder ein Metalldraht eingesetzt werden. Die Geschwindigkeit der rotierenden Gegenelektrode muss dabei so eingestellt werden, dass diese im Bereich der Faserabscheidungsgeschwindigkeit liegt<sup>[33]</sup>. Die Fasern werden dabei aufgerollt und zusätzlich verstreckt.

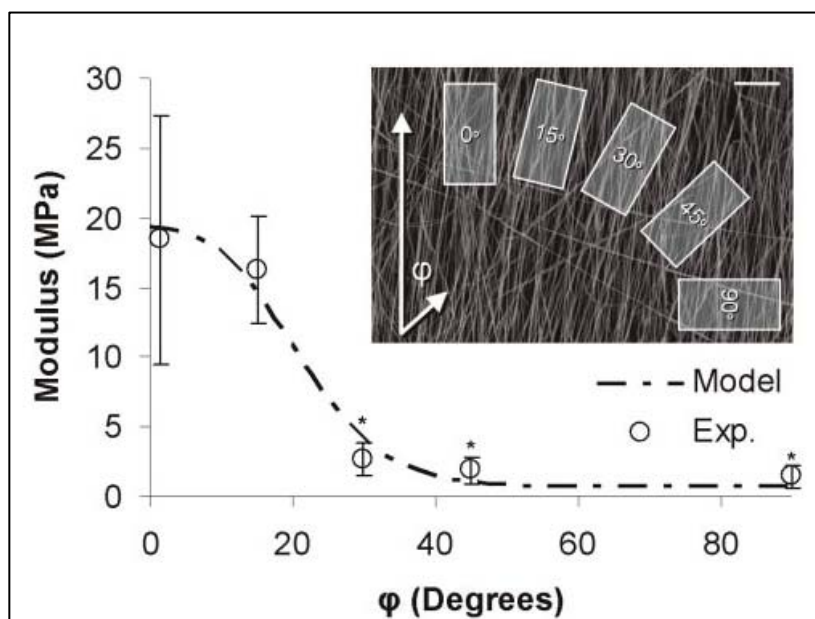
In den Arbeiten von R. DERSCH<sup>[8]</sup> wurde eine Aluminiumrolle (Abbildung 2.6A) verwendet, die in die vorhandene Elektrospinnanlage eingebracht werden konnte. Diese Rolle erreichte bis zu 3500 Umdrehungen pro Minute und konnte somit die Fasern orientieren (Abbildung 2.6B). Diese Fasern konnten anschließend entfernt und weiter verwendet werden.



**Abbildung 2.6:** A) Rotierende Rolle als Gegenelektrode

B) Orientierte Poly(l-lactid)faser durch Elektrosinnen auf eine rotierende Rolle <sup>[8]</sup>

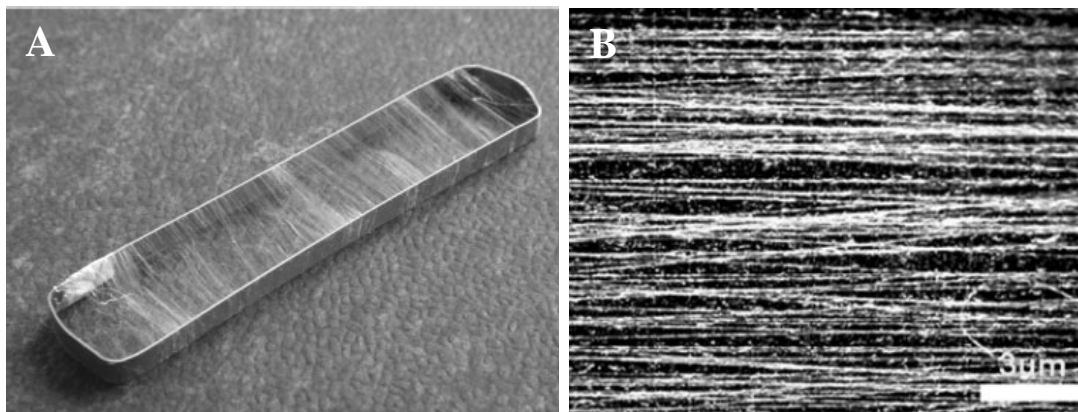
Durch die Orientierung der Fasern wird das Faservlies entlang der Fasern deutlich verstärkt. NERUKAR et al.<sup>[34]</sup> untersuchte die mechanischen Eigenschaften von orientierten Fasern. Dabei wurden Zug-Dehnungsversuche bei unterschiedlichen Winkeln von 0° (entlang des Faservlieses) bis 90° (quer zum Faservlies) an der orientierten Fasermatte durchgeführt (Abbildung 2.7). Mit Zunahme des Winkels nahm dabei das Elastizitätsmodul des orientierten Faservlieses deutlich ab.



**Abbildung 2.7:** Experimentelle Ergebnisse der Zug-Dehnungsversuche von NERUKAR<sup>[34]</sup> an orientierten Faservliesen

### 2.1.3.2 Freitragende Faservliese

Wie schon beschrieben ist es bei einigen Anwendungen notwendig, freitragende Faservliese zu erhalten, die einen Zugang zur Ober- und Unterseite des Faservlieses bieten. Das Elektrospinnen auf einen leitenden Metallrahmen (Abbildung 2.8A) kann z.B. genutzt werden, um solche freitragende Faservliese zu generieren<sup>[35]</sup>. Es wird zunächst für wenige Faserlagen ein hoher Orientierungsgrad erreicht (Abbildung 2.8B). Die darüberliegenden Fasern scheiden sich anschließend ohne Vorzugsrichtung ab.



**Abbildung 2.8:** A) Freihängende Polymerfasern auf einem Metallrahmen  
B) Orientierte Fasern generiert auf einem Metallrahmen<sup>[35]</sup>



## 2.2 Gewebezüchtung (*Tissue Engineering*)

### 2.2.1 Einführung und Definition

Der menschliche Körper und seine inneren und äußeren Organe sind in unserer Umwelt ständigen Gefahren ausgesetzt. So können durch einen Unfall Organe verletzt werden und die Funktion dieser Organe auf Dauer aussetzen. Bei Brandopfern wird z.B. das größte und lebensnotwendige Organ, die Haut, verletzt. Wenn die Schwere des Verbrennungsgrades und die kritische Oberfläche der verletzten Haut überschritten werden, verstirbt das Opfer. Die Haut übernimmt nämlich lebensnotwendige Funktionen, wie die Atmung durch die Haut, Schutz vor Infektionen und die Wärmeregulation durch das Schwitzen. Ein plötzlich eintretendes Ereignis, wo grosse Kräfte auf den menschlichen Körper einwirken, wie bei einem Autounfall, kann zu inneren Verletzungen, wie Knochendefekten führen, die unter Umständen nicht mehr heilen können.

Auch Erkrankungen von Organen spielen bei einer immer älter werdenden Gesellschaft eine große Rolle. Hier nimmt die Häufigkeit von osteodegenerativer Erkrankungen, wie die Osteoporose und die Osteoarthritis stark zu<sup>[36]</sup>. Hierbei wird der Knochen zerstört und kann mit dem Fortschreiten der Krankheit seine stützende Funktion verlieren. Der zerstörte Knochen muss schließlich ersetzt werden. Auch bestimmte Tumorarten können Knochengewebe zerstören und unbrauchbar machen. Ab dem 50. Lebensjahr tritt eine weitere Krankheit immer häufiger auf. Es handelt sich um die Altersabhängige Makuladegeneration (AMD). Dabei werden durch Störung des Stoffwechsels Sehzellen zerstört. Dies führt zur kontinuierlichen Abnahme der Sehschärfe und schließlich zur Erblindung des Patienten<sup>[37]</sup>.

Der Bedarf an Organen, wie z.B. Leber, Niere, Herzklappen, Knorpel, Lunge und Trachea allein in Deutschland ist so gross und die Verfügbarkeit so gering, dass vermehrt Menschen an Organversagen sterben, bevor sie eine Organspende erhalten. Da es zu wenige Organspender gibt und der Bedarf enorm hoch ist hat sich in diesem Bereich seit Jahren die Kriminalität stark entwickelt<sup>[38]</sup>. Da es Menschen gibt, die alles dafür tun würden um ein neues Organ zu bekommen hat sich in vielen Ländern dieser Welt und besonders im asiatischen Raum der Organhandel entwickelt. Hier werden Menschen betäubt und wachen z.B. ohne Niere auf. Das ist jedoch nur die „harmlose“ Variante der unerlaubten Organentwendung. Für weitere Ausführungen zum Thema Organhandel verweise ich auf die

zahlreichen aktuellen Berichte in Zeitungen, Zeitschriften und Fernsehen. So berichtete der Fernsehsender ARD in einer Reportage im Mai 2009 von vermehrt und wiederholt vorkommenden Entführungen von Kindern und Erwachsenen, bei denen den Opfern verschiedene Organe entnommen werden und diese in der Folge meist den Tod finden, da sie nicht medizinisch versorgt werden<sup>[38]</sup>.

Im Gegensatz zu diesem illegalen und entsetzlichen Weg neue Organe zu erhalten, gibt es weltweit grosse Anstrengungen durch verschiedene Materialien und Methoden die Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit ganzer Organe zu erreichen. Dabei wird in der Regel körperfremdes Material, wie z.B. künstliche Implantate oder Prothesen verwendet, in dem Versuch die ursprüngliche Funktionsfähigkeit wieder herzustellen<sup>[39]</sup>. Man versucht auch körpereigene Materialien durch die richtige Materialienwahl nachzuahmen. So können allogene (vom Patienten oder anderen Menschen) oder xenogene (vom Tier) Organe transplantiert werden. Diese menschlichen und tierischen Organe können jedoch Infektionen und Immunreaktionen verursachen<sup>[40]</sup>.

Das autologe (nur vom Patienten selbst) Material steht nur stark begrenzt zur Verfügung. Deswegen wird in einem alternativen Weg durch gezielte Nachzüchtung versucht, Gewebe oder ganze Organe zu erhalten. Das Tissue Engineering ist ein junges und multidisziplinäres Wissenschaftsgebiet aus Medizin, Pharmazie, Biologie und Materialwissenschaften mit dem Ziel der Herstellung von Gewebe oder Organen für den Ersatz des erkrankten oder zerstörten Gewebes im humanen Organismus. Der Ausdruck „Tissue Engineering“ wurde ursprünglich im Jahr 1987 von Y. C. FUNG im Zuge eines Treffens der National Science Foundation (NSF) geprägt. Ein Jahr später wurde während eines Workshops der NSF mit dem Titel „*Tissue Engineering*“ eine erste Definition zu diesem Begriff gegeben. Diese Definition war jedoch weit davon entfernt von dem, was man heute unter dem Begriff Tissue Engineering versteht. So sollte lebendes Gewebe manipuliert werden um es dann, wenn es möglich ist, mit prothetischen Materialien zu kombinieren. Die Möglichkeit der Züchtung neuer Gewebe allein oder auf einem passenden Gerüstmaterial wurde kaum beachtet.

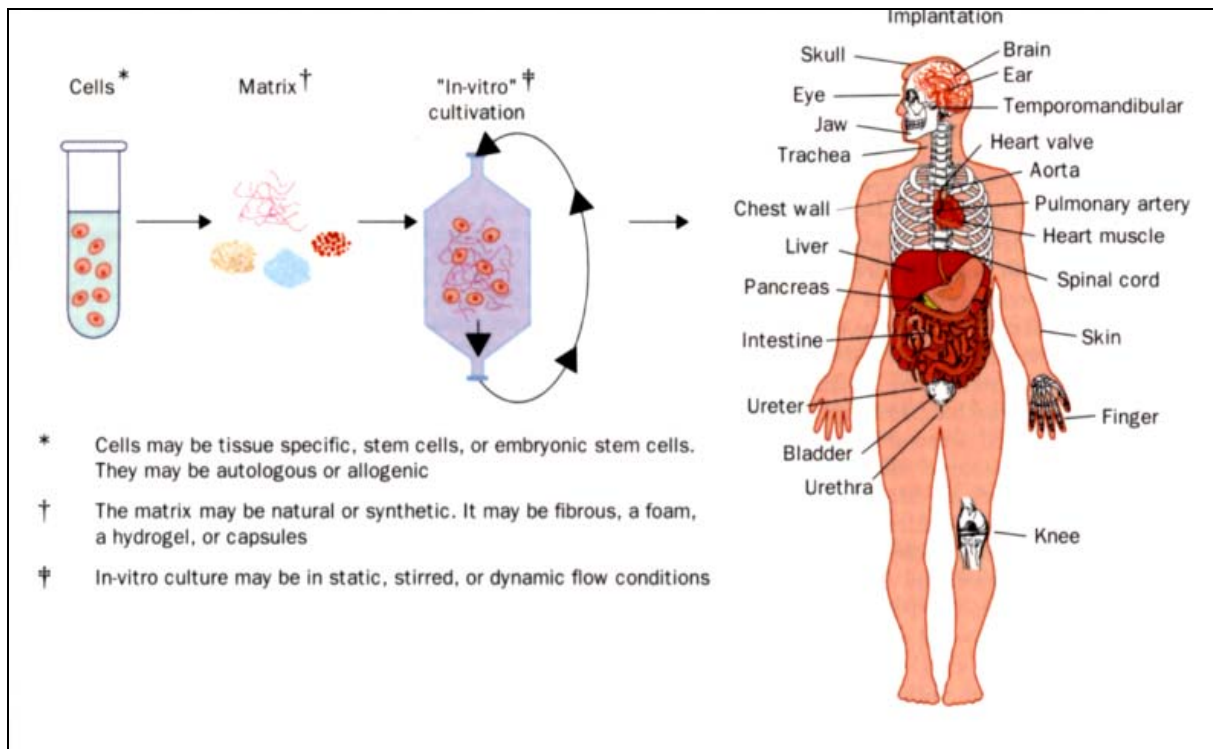
R. LANGER und J. P. VACANTI schrieben im Jahr 1993 in ihrem Artikel „Tissue Engineering“ weiterhin: „Das Ziel von Tissue Engineering ist, die Beschränkungen der konventionellen Behandlung, also der Implantation von Fremdorganen oder Biomaterialien, hinter sich zu lassen und aus den entsprechenden Zellen das benötigte dreidimensionale Organ oder Gewebe in vitro zu kultivieren“<sup>[41]</sup>.

Eine weitere Definition von C. T. LAURENCIN<sup>[42]</sup> macht es weiterhin deutlich, dass heute mehrere Strategien verfolgt werden: „Tissue Engineering ist die Anwendung biologischer, chemischer und technischer Grundsätze und Methoden zur Reparatur oder Regeneration von lebendem Gewebe durch den Einsatz von Biomaterialien, Zellen und Faktoren, allein oder in Kombination“.

Im Übersichtsartikel von TEEBKEN et al<sup>[43]</sup> werden drei unterschiedliche Ansätze genauer beschrieben<sup>[5]</sup>: Im ersten Ansatz, dem *Selektiven Zelltransfer*, kann die Geweberegeneration gefördert werden, indem eine systemische oder lokalisierte Injektion von autologen, allogenen oder xenogenen Zellpräparationen durchgeführt wird. Das führt zur Erhöhung der Konzentration eines spezifischen Zelltyps im Blut oder einer bestimmten Region (z.B. Stammzellinjektion in den absterbenden Herzmuskel). Im zweiten Ansatz, der *Guided Tissue Regeneration*, wird eine primär stabile Matrix, welche die Form des späteren Ersatzes vorgibt, in einen Empfänger implantiert. Diese Matrix reift durch die Besiedlung mit autologen Zellen *in vivo* zum funktionsfähigen Organ oder Gewebe heran. Als Beispiel kann hierbei die azellularisierte Herzklappe genannt werden, die erst nach der Implantation mit Empfängerzellen rebesiedelt wird. Im dritten Ansatz wird im klassischen Sinne des *Tissue Engineerings* die Besiedlung von Matrices mit Zellen durchgeführt, um Gewebe oder sogar ganze Organe *in vitro* zu generieren.

Die Eigenschaften eines idealen Ersatzmaterials werden im Übersichtsartikel von TEEBKEN et al<sup>[43]</sup> weiterhin wie folgt beschrieben: „Ein ideales Ersatzmaterial soll autologes Gewebe sein und keine Infektionen oder Krankheiten verursachen. Es soll keine krebserregende Wirkung haben und zu keinen Fehlbildungen des Gewebes führen. Das Ersatzmaterial sollte lebenslang haltbar sein, d.h. es sollte gute mechanische Eigenschaften haben wie z.B. Stabilität, Druckbeständigkeit und Dehnbarkeit. Es soll eine hohe Biokompatibilität und ein hohes Besiedlungspotential verfügen. Es soll reparierbar und wenn nötig umformbar sein. Das Ersatzmaterial muss unbegrenzt verfügbar, einfach implantierbar und kostenneutral sein.“

Die Anforderungen an das ideale Ersatzmaterial sind sehr groß. In der Abbildung 2.10 wird deutlich, dass praktisch jedes Gewebe im menschlichen Körper nachgezüchtet werden kann. So werden bestimmte Zellen auf einer Matrix angesiedelt und vermehrt. Bei dieser *in vitro* Kultivierung kann ein Gewebe oder sogar ein ganzes Organ erhalten werden um im nächsten Schritt implantiert zu werden<sup>[44]</sup>.



**Abbildung 2.10:** Darstellung des Tissue Engineerings nach dem klassischen Sinne<sup>[44]</sup>

Das Fernziel des Tissue Engineerings ist klar definiert: Krankes oder zerstörtes Gewebe eines Patienten sollte dadurch ersetzt werden, dass man dem gleichen Patienten in einer kleinen Biopsie spezifische Zellen entnimmt, diese Zellen in einer Kultur vermehrt und diese dann auf einer drei-dimensionalen Matrix zu einem Organ heranzüchtet und das fertige Organ schließlich dem gleichen Patienten wieder implantiert<sup>[45]</sup>. Das schnelle Nachzüchten von ganzen Organen soll zur Routine werden, ähnlich wie in der Eigenbluttherapie<sup>[46]</sup>. Bei der Eigenbluttherapie wird dem Patienten aus der Armvene eine bestimmte Menge Blut entnommen, das Blut z.B. mit einem Ozon-Sauerstoffgemisch angereichert, um es anschließend wieder in die Muskeln zu injizieren. Das körpereigene Blut dient hier als Fremdkörperreiz und regt das Immunsystem an.

### 2.2.2 Stamm- und Vorläuferzellen

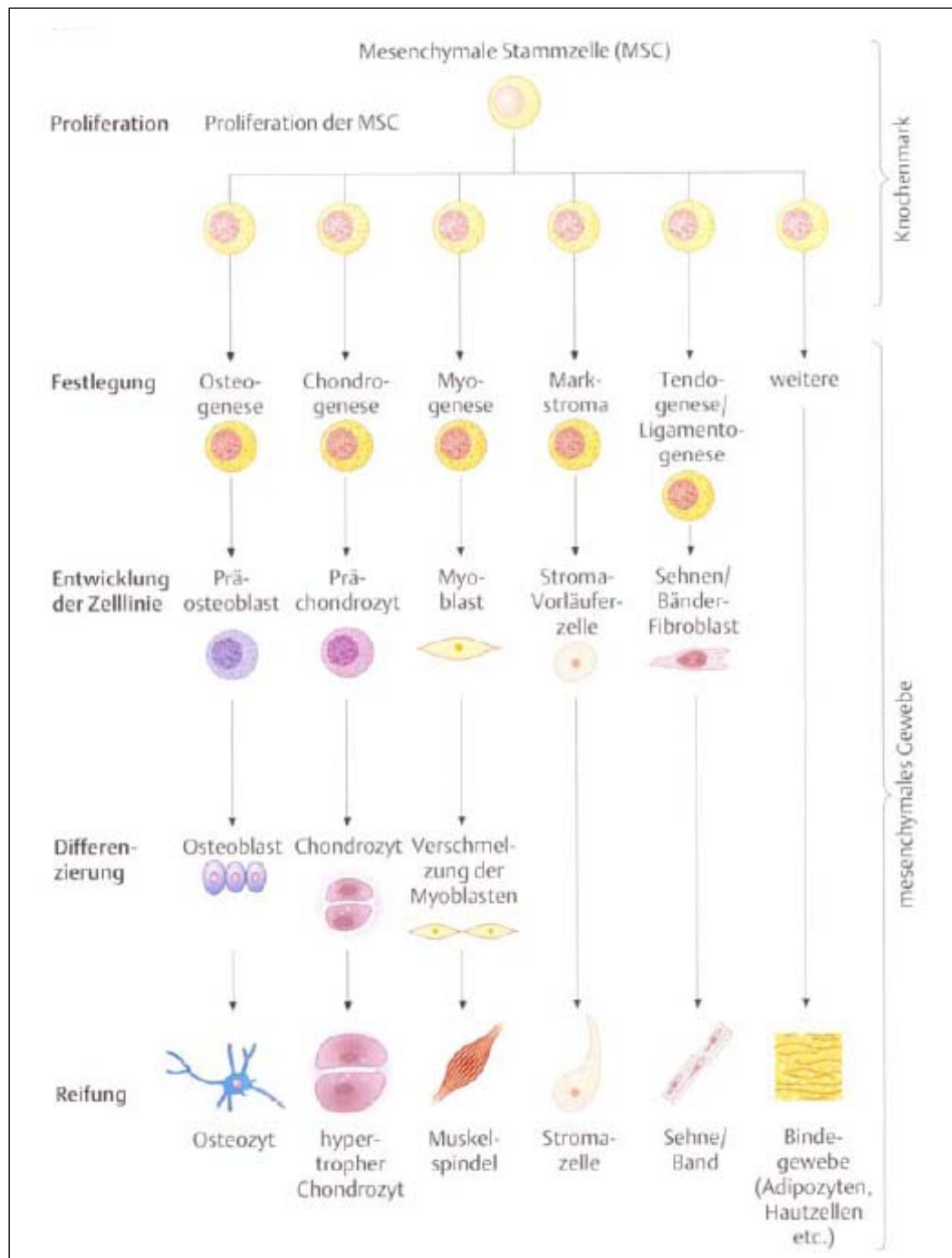
Der Prozess des Tissue-Engineerings beginnt mit der Auswahl der Zellquelle. Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, stehen dafür autologe, allogene und xenogene Zellen zur Verfügung. Die autologe Zelle ist der am besten geeignete Zelltyp für das Tissue Engineering, da keine Unverträglichkeiten auftreten können. Allogene und xenogene Zelltypen können dagegen zu Entzündungsreaktionen führen.

Zur Anwendung im Tissue Engineering kommen vollständig differenzierte Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Keratinozyten und Chondrozyten. So wurden Chondrozyten bereits zur Therapie von Knorpelschäden verwendet<sup>[47]</sup>. Nach entsprechender Differenzierung können periphere Venen, humane Umbilikalvene, arterielle oder dermale Fibroblasten, vaskuläre Prekursorzellen aus Nabelschnur- oder peripherem Blut und mesenchymale Stammzellen für das Tissue Engineering verwendet werden<sup>[47]</sup>. Abhängig von ihrer Herkunft zeigen die Zellen unterschiedliche Morphologien, proliferative Kapazität und Funktionalität auf.

In dieser Arbeit werden in einem Kooperationsprojekt mit der Orthopädie Marburg mesenchymale Stammzellen auf eine Polymermatrix aufgebracht und das Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten untersucht. Mesenchymale Stammzellen unterscheiden sich stark von anderen Zelltypen. So besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelllinien<sup>[48]</sup>. Diese Fähigkeiten machen mesenchymale Stammzellen für Gewebezüchtung besonders interessant. Das Ziel ist es, die experimentellen Bedingungen so gezielt einzustellen, dass sich die gewünschte Zelllinie an dem vorgesehenen Bereich ausdifferenzieren kann.

Es gibt embryonale und adulte Stammzellen. Dabei kommen die embryonalen Stammzellen in den frühesten Stadien der embryonalen Entwicklung vor. Diese sind pluripotent und können in alle möglichen Zelllinien differenzieren. Diese Eigenschaft führt jedoch zu einer unerwünschten Differenzierung am Zielort einer Transplantation. Adulte Stammzellen dagegen kommen in geringerer Menge im Körper vor. Durch Umgebungseinflüsse können diese in bestimmte Zelltypen differenzieren. Aus dem Knochenmark können mesenchymale Stammzellen gewonnen werden. In den Arbeiten von PITTENGER et al<sup>[49]</sup> wird gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen in Knochen-, Knorpel-, Fett-, Sehnen- und Muskelgewebe differenzieren können. Die Osteogenese, d.h. die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Knochengewebe, wurde z.B. durch Prostaglandin E<sub>2</sub>, 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Ascorbat induziert<sup>[50]</sup>. Der Nachweis erfolgte durch die exprimierte alkalische Phosphatase und Hydroxyapatitanreicherung.

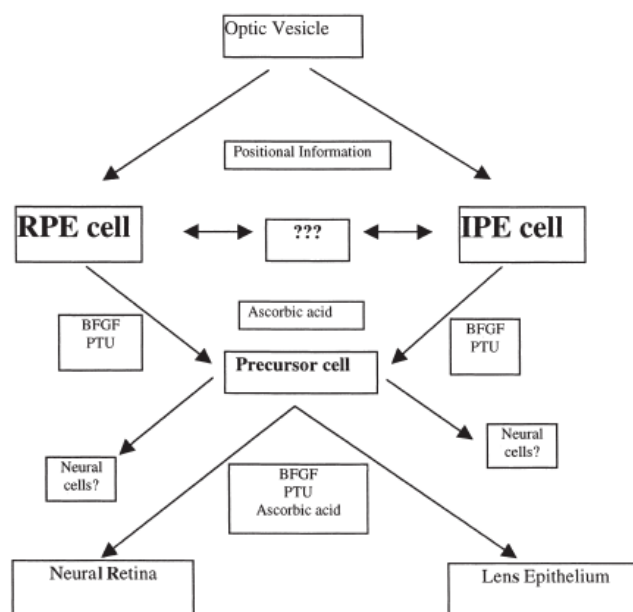
In der Abbildung 2.11 wird deutlich, wie sich aus einer mesenchymalen Stammzelle die unterschiedlichen Zelltypen entwickeln können. Bei der Proliferation wächst und vermehrt sich die mesenchymale Stammzelle. Durch vorliegende Umgebungseinflüsse kommt es zur Festlegung der Zelllinie. Bei der Osteogenese oder Ossifikation wird Knochengewebe gebildet. Dabei differenziert die mesenchymale Stammzelle zum Osteoblasten. Aus den Osteoblasten entstehen schließlich Osteozyten. Diese sind einkernige Zellen, die in der mineralisierten Knochenmatrix liegen.



**Abbildung 2.11:** Entstehung unterschiedlicher Zelltypen aus einer mesenchymalen Stammzelle<sup>[51]</sup>

In einer weiteren Kooperation mit der Universitätsaugenklinik Aachen werden Retinales Epithel und Irispigmentepithel verwendet. Dazu wird im Abschnitt 2.2.3.2 der Aufbau der Netzhaut dargestellt.

Autologe humane Retinale Pigmentepithelzellen (RPE) können nur mit aufwendigen chirurgischen Techniken gewonnen werden<sup>[52]</sup>. Dagegen können die Irispigmentepithelzellen (IPE) mittels einer Iridektomie einfach isoliert werden. Die IPE-Zellen dienen hierbei als embryogenetisch verwandter zellulärer Ersatz für degenerierte Retinale Pigmentepithelzellen. Bei der embryonalen Entwicklung entsteht aus dem inneren Blatt des Augenbechers das posteriore Irispigmentepithel und die Neuroretina. Aus dem äußeren Blatt entstehen dagegen das anteriore Stroma und das Retinale Pigmentepithel. Sowohl IPE- als auch RPE-Zellen behalten bis in das Erwachsenenalter hinein die Fähigkeit, in andere Zellarten, wie z.B. Linsenepithelzellen als auch Neuroretinazellen transdifferenzieren zu können<sup>[53-54]</sup>. Daher kann angenommen werden, dass IPE-Zellen abhängig von ihrer Umgebung in RPE-Zellen transdifferenzieren können (Abbildung 2.12). Dabei können die RPE- und IPE-Zellen mit bestimmten Stimuli wieder in eine Vorläuferzelle dedifferenzieren und in RPE-, IPE-, Linsenepithelium oder in die Neuroretina redifferenzieren<sup>[54]</sup>.

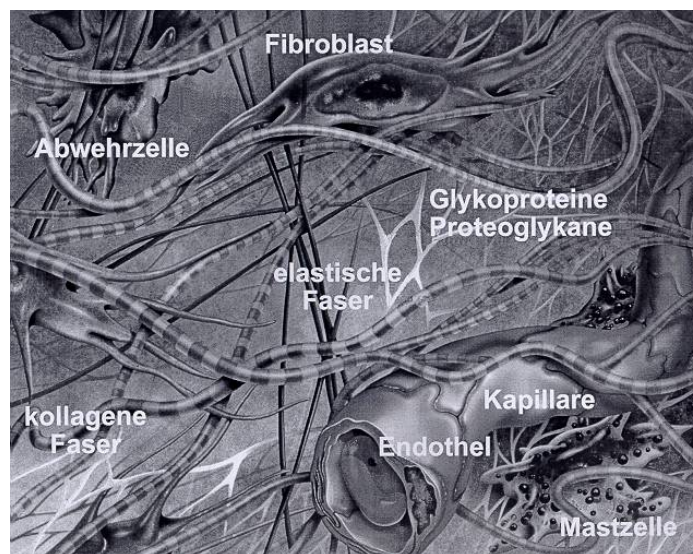


**Abbildung 2.12:** Mögliche Stadien der Transdifferenzierung von RPE- und IPE-Zellen<sup>[54]</sup>

Verschiedene Laboruntersuchungen konnten zeigen, dass IPE-Zellen ein gewisses Spektrum von funktionellen und morphologischen RPE-Eigenschaften aufweisen. So zeigte ein Vergleich der Expression eines breiten Spektrums von Zytokinen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein in 94 % übereinstimmendes Zytokinspektrum in IPE- und RPE-Zellen<sup>[55]</sup>.

### 2.2.2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist der Gewebeanteil zwischen den Zellen<sup>[56]</sup>. In diesem Interzellularraum setzt sich die EZM aus unterschiedlichen Komponenten zusammen (Abbildung 2.13). Diese lassen sich in zwei grosse Gruppen einteilen: Dies sind zum einen die Grundsubstanz und zum anderen die Fasern. Oberflächlich betrachtet dient die EZM primär als Fixierungsmöglichkeit für die in ihr eingebetteten Zellen. Bei genauerer Betrachtung wird aber klar, dass zwischen den Zellen und der EZM stets eine wechselseitige Beeinflussung herrscht. Die einzelnen Komponenten der EZM werden von den Zellen selbst synthetisiert. Darüber hinaus wird durch Bindung an bestimmte Komponenten der EZM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert. Durch die Wechselwirkung der EZM mit der Zelle werden die Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau und Umbau von Gewebe beeinflusst und bestimmt<sup>[56]</sup>.



**Abbildung 2.13:** Extrazelluläre Matrix mit ihren natürlichen Strukturen wie Kollagenfasern<sup>[57]</sup>

Mikroskopisch ist die EZM im gesamten Körper vorhanden. Fast jedes Gewebe wird durch die EZM zusammengehalten, so ist zum Beispiel jede Muskelfaser von retikulären Fasern umspinnen. An dieser Stelle sollen einige wichtige Arten der EZM genannt werden. Es handelt sich um die mineralisierte Matrix des Knochens, die druckelastische Substanz des Knorpels oder die straffen Fasern der Sehnen.



Im Folgenden werden die Funktionen und Wechselwirkungen der EZM in verschiedenen Geweben und Organen zusammengefasst dargestellt. Die EZM ist verantwortlich für:

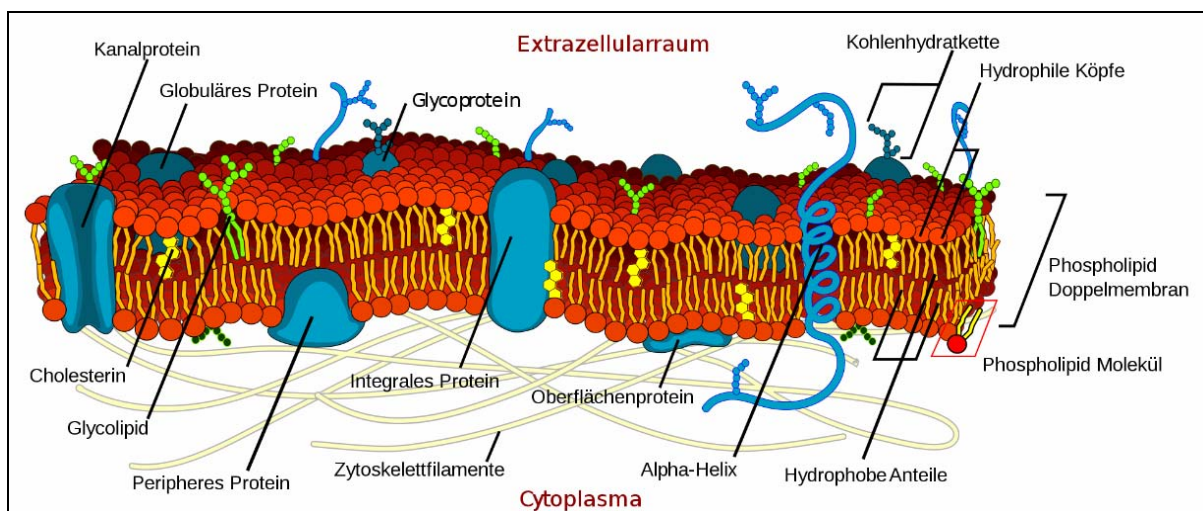
- die Formgebung und Elastizität des Gewebes
- den Wassergehalt des Gewebes
- die Zugfestigkeit und Stabilität der Knochen, Sehnen und Bänder
- die Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen
- die Beeinflussung von Wundheilungsprozessen

Wie schon erwähnt besteht die EZM aus faserigen Bestandteilen und Flüssigkeit. In dieser Flüssigkeit liegen vor allem Wasser, verschiedene Glykoproteine und Polysaccharide vor. Weiterhin sind auch Nährstoffe vorhanden, wie Aminosäuren und Glukose, sowie Gewebshormone und Elektrolyte. Die faserigen Bestandteile können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Es sind die Proteinfamilie der Kollagene und die Kohlenhydrate. Die Kollagene können dabei verschiedene Arten von Fasern bilden und sind fast in jedem Gewebe vorhanden. Die Kollagenfasern verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit. Der Faserdurchmesser liegt dabei zwischen 2 und 20 Mikrometern und die Faser selbst besteht aus Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von bis zu 130 Nanometern<sup>[56]</sup>. Jedes auf Zug beanspruchte Bindegewebe enthält Kollagenfasern, die in Richtung der Belastung ausgerichtet sind. Wird das Gewebe in nur eine Richtung stark beansprucht, wie bei Sehnen und Bändern, werden die Fasern parallel zur Zugrichtung ausgerichtet.

Die Bindung zwischen den Zellen und der EZM werden durch verschiedene Adhäsionsproteine vermittelt. Diese Adhäsionsproteine sind Bestandteile der EZM und interagieren mit Zellrezeptoren. Bei den Adhäsionsproteinen handelt es sich um Glykoproteine, wie z.B. Vitronektin und Fibronektin. Die Glykoproteine haben bestimmte Aminosäure-Bindungssequenzen, die von Zellrezeptoren erkannt werden. Die wohl bekannteste Erkennungssequenz ist die RGD-Sequenz, die aus den drei Aminosäuren, Arginin, Glycin und Asparagin aufgebaut wird<sup>[58]</sup>. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Zellbindungssequenzen, die aber an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden sollen.

### 2.2.2.2 Zellmembran und Integrin-Rezeptoren

Um die Wechselwirkung zwischen einer Zelle und einer extrazellulären Matrix zu verstehen, ist es notwendig, die Oberfläche einer Zelle genauer darzustellen<sup>[59]</sup>. Die Zelle wird von einer Zellmembran umgeben (Abbildung 2.14). Dabei wird eine charakteristische chemische Stoffverteilung im Zellinneren aufrechterhalten. Die Zellmembran bildet die Abgrenzung zwischen unterschiedlichen Zellen. Durch die Zellmembran findet außerdem der Stoffaustausch statt. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht in einer Stärke von etwa 6 bis 10 nm<sup>[59]</sup>. An der Außenseite der Zellmembran befinden sich oft kurzkettige und verzweigte Proteine und Lipide. Es handelt sich hierbei um die bereits erwähnten Glykoproteine und Glykolipide. Diese nach außen ragenden Strukturen der Zellmembran haben u. a. die Funktion eines Rezeptors.



**Abbildung 2.14:** Aufbau einer Zellmembran mit unterschiedlich nach außen ragenden Strukturen, wie Integrinrezeptoren<sup>[59]</sup>

Im Fokus der Forschung stehen vermehrt die Integrinrezeptoren einer Zellmembran. Integrine sind eine Klasse von Zellrezeptoren, die für die Zellproliferation, Zellform, Migration, Adhäsion und Differenzierung vieler Zelltypen entscheidend sind (Abbildung 2.15)<sup>[60]</sup>. Viele Forschungsgruppen konnten zeigen, dass insbesondere der  $\alpha5\beta1$ -Integrinrezeptor für die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und für die Entzündung und Narbenbildung (Fibrose) von entscheidender Bedeutung ist<sup>[61-63]</sup>. Eine übermäßige Neubildung von Blutgefäßen tritt bei einer Reihe von Indikationen wie beispielsweise Krebs und der alterabhängigen Makuladegeneration (AMD) auf. Es besteht die Möglichkeit, durch

bestimmte Therapeutika die biologische Funktion des  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinrezeptors zu inhibitieren und eine Hochregulation bei krankhaften Prozessen zu vermeiden.

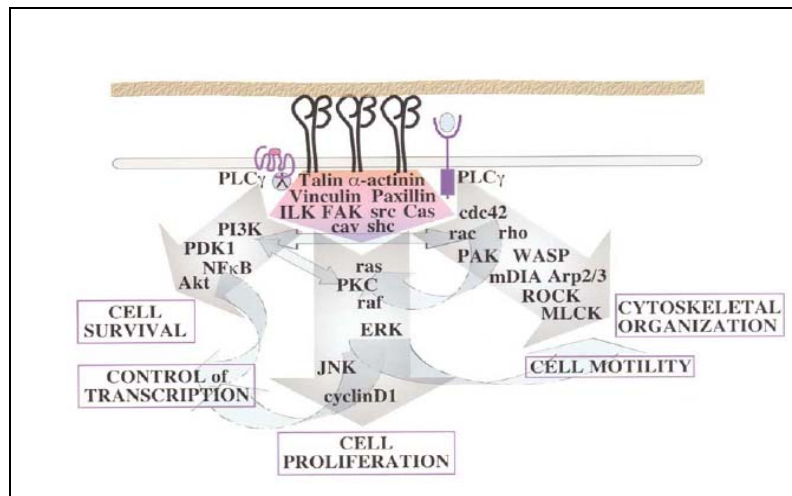


Abbildung 2.15: Signalverarbeitung und Weiterleitung der Integrinrezeptoren<sup>[60]</sup>

Bei der Zelladhäsion spielen die Integrinrezeptoren eine entscheidende Rolle. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, die mittels Calcium-Ionen extrazellulär aneinander gebunden sind. Die beiden Untereinheiten des Integrinrezeptors erkennen gemeinsam eine entsprechende Aminosäure-Bindungssequenz im Proteinanteil der EZM-Komponenten und sind somit für die Zellbindung an die EZM-Matrix verantwortlich. Speziell soll hier die RGD-Sequenz (R = Arginin; G = Glycin; D = Asparaginsäure) als Erkennungssequenz genauer betrachtet werden. Die RGD-Aminosäuresequenz wechselwirkt mit der RGD-Rezeptor-Familie der Zellmembran (Abbildung 2.16). Es sind die Integrin-Rezeptoren  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$ ,  $\alpha v \beta 8$ ,  $\alpha I I b \beta 3$  und  $\alpha 1 \beta 5$ <sup>[60]</sup>

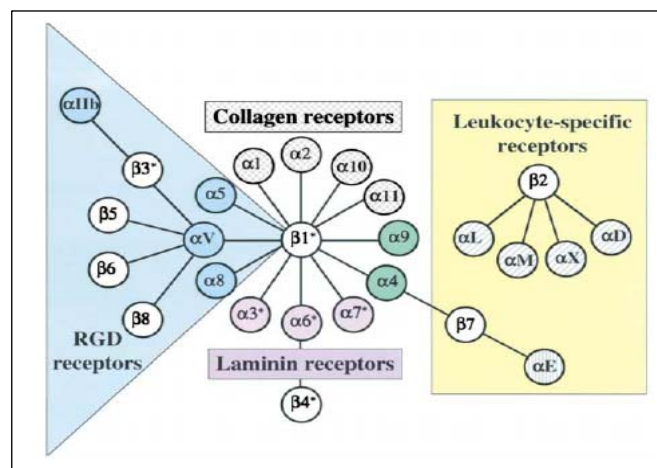
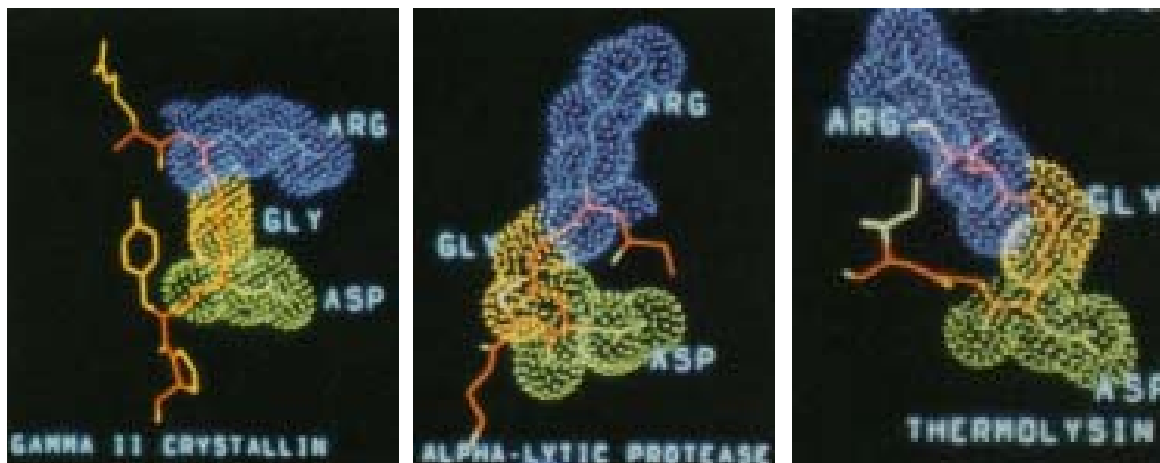


Abbildung 2.16: Integrin-Rezeptor-Familie der Zellmembran<sup>[60]</sup>

Die RGD-Sequenz ist in verschiedenen Adhäsionsproteinen vorhanden. Diese sind z.B. Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagen und Fibrinogen<sup>[61]</sup>. Dabei kann die RGD-Sequenz in den unterschiedlichen Proteinen eine andere Konformation besitzen (Abbildungen 2.17). So können bestimmte Adhäsionsproteine nur an bestimmte Zellrezeptoren binden. Beispielsweise hatte nach einigen Untersuchungen der Fibronectin- und der Kollagenrezeptor keine Affinität zu kurzen Peptiden mit einer RGD-Sequenz<sup>[61]</sup>. Es resultierte eine 100 bis 1000fache Abnahme der Bindungsaffinität von Fibronectinrezeptor zu einer RGD-Sequenz, GRGDSP, im Vergleich zu Fibronectin selbst. Die Konformation einer RGD-Sequenz im Protein ist dafür verantwortlich, wie stark die Wechselwirkung zwischen dem Zellrezeptor und dem Adhäsionsprotein vorliegt. Eine „inaktive“ RGD-Sequenz führt dazu, dass keine oder nur geringe Zellbindung an die EZM stattfinden kann. Weiterhin sind Zelladhäsionsrezeptoren für die Differenzierung und Proliferation der Zellen verantwortlich.



**Abbildungen 2.17:** Unterschiedliche Konformationen der RGD-Sequenzen in Proteinen<sup>[61]</sup>

Der Prozess der RGD-vermittelten Zelladhäsion kann in vier Abschnitte eingeteilt werden<sup>[62]</sup>. Im ersten Abschnitt stellt die Zelle einen Kontakt zur Oberfläche her. Dabei entstehen Ligandenbindungen an die Matrix und ermöglichen es der Zelle, gegen leichte Scherkräfte Widerstand zu leisten. Im zweiten Abschnitt der Zellspreitung verflacht der Zellkörper und seine Plasmamembran breitet sich auf der Oberfläche aus. Im dritten Abschnitt findet eine Aktinorganisation zu Mikrofilamentbündeln statt, die zur Stabilisierung des Zellkörpers dienen. Im vierten Abschnitt, der fokalen Adhäsion, werden die Moleküle des Aktin-Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbunden. Die fokale Adhäsion wird durch die Zellintegrinrezeptoren und die RGD-Sequenzen der Matrix ermöglicht.

Die Signalübertragung der Integrine verläuft in beiden Richtungen, d.h. vom Zellinneren zur ECM und umgekehrt von der ECM zum Zellinneren. Vom Inneren der Zelle, wird z.B. die extrazelluläre Bindungsaktivität reguliert (Inside-Out-Signal). Von den Bindungsstellen der EZM werden weiterhin Signale in das Innere der Zelle übertragen (Outside-In-Signal)<sup>[66-67]</sup>. Die Integrin-RGD-Bindung und die transmembranale Signalweiterleitung erfordern demnach mehrere Strukturänderungen der Integrine<sup>[68]</sup>. Das Zusammenspiel der Zell-Matrix-Interaktion und der Zell-Zell-Interaktion beeinflussen in hohem Maße die Zelladhäsion. Sind diese beiden komplexe Mechanismen gut aufeinander abgestimmt, sind optimale Voraussetzungen für die Zelladhäsion geschaffen.

### 2.2.3 Gewebeaufbau und -bildung

In folgenden beiden Kapiteln soll der Knochenaufbau und die Bildung eines Knochens dargestellt werden. Weiterhin soll der Aufbau der Netzhaut beschrieben werden.

#### 2.2.3.1 Aufbau und Bildung des Knochengewebes

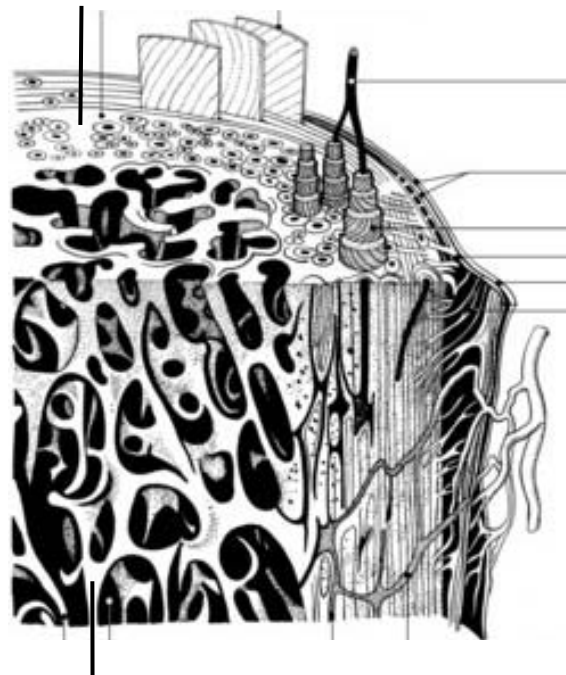
Das Knochengewebe besteht aus unterschiedlichsten Bestandteilen. Es zeichnet sich durch seine hohe Belastungsfähigkeit aus und bildet die stützende Funktion als menschliches Skelett<sup>[69]</sup>. Das Knochengewebe hat die Eigenschaftskombination Härte bei geringem Gewicht bei einer gewissen Elastizität. Der Knochen dient weiterhin als Kalziumspeicher und das Knochenmark zur Blutbildung. Etwa 2 % der Knochenmasse bilden die Knochenzellen. Der Rest wird durch die schon beschriebene extrazelluläre Matrix (EZM) dargestellt. Im Knochen enthält die EZM anorganische Bestandteile, wie Hydroxylapatit, die dem Knochen seine Druckfestigkeit verleihen<sup>[69]</sup>.

Chemisch setzt sich das Knochengewebe aus 70 % anorganischen Anteil und aus 22 % organischer Matrix zusammen. Der Restanteil stellt das Wasser dar. Der Lamellenknochen wird hauptsächlich durch zwei Knochensubstanzen gebildet<sup>[51, 70]</sup>. Die *Substantia compacta* ist ein kompakter Knochen, der den äußeren Bereich des Knochengewebes darstellt und vor allem für die mechanische Stabilität verantwortlich ist (Abbildung 2.18). Im Inneren des

Knochens liegt die schwammartige *Substantia spongiosa* in Form von dünnen Knochenbälkchen und erfüllt überwiegend metabolische Aufgaben.

Im Knochengewebe liegen vier verschiedene Knochenzelltypen vor. Es sind die Osteoblasten, die Osteozyten, die bone lining cells und die Osteoklasten<sup>[71]</sup>.

*Substantia compacta*



*Substantia spongiosa*

**Abbildung 2.18:** Aufbau eines Lamellenknochens<sup>[70]</sup>

**Osteoblasten** entstehen aus den Knochenvorläuferzellen und sind für die Bildung der organischen Knochenmatrix verantwortlich. Die Matrix ist noch nicht mineralisiert und wird auch Osteoid genannt. Diese besteht vor allem aus Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Osteoblasten haben die Größe von 20  $\mu\text{m}$  und haben eine kubische Form. Weiterhin wird das Enzym alkalische Phosphatase in grösserer Menge ausgeschieden, welches das Osteoid auf die Mineralisierung vorbereitet. Die Steuerung der Osteoblasten erfolgt über Zellrezeptoren, wo verschiedene Proteine wie BMP oder Parathormone andocken können. Wenn Osteoblasten zum weiteren Knochenaufbau nicht mehr benötigt werden, entstehen daraus entweder Osteozyten oder Deckzellen an der Knochenoberfläche oder sie sterben einfach ab.

**Osteozyten** entstehen aus Osteoblasten und haben eine Größe von 20 bis 60 µm. Osteozyten werden in die mineralisierte Knochenmatrix eingebaut und bilden Zellfortsätze, die dem Stoffwechsel zwischen anderen Osteozyten dienen. Außerdem werden die inneren und äußeren Knochenoberflächen sowie Blutgefäße miteinander verbunden. Die Funktion dieser Zellen ist es, den Knochen und die umgebende Matrix zu erhalten

**Bone lining cells** sind inaktive Zellen, die keine Knochensubstanz aufbauen oder umbauen können. Sie besitzen eine flache und gestreckte Gestalt und bedecken die Knochenoberfläche. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass bone lining cells inaktive Osteoblasten sind, die durch bestimmte Botenstoffe wieder aktiviert werden können<sup>[72]</sup>. Sie können vermutlich für eine Kalziumausschüttung sorgen, falls der Blutgehalt zu niedrig wird und schützen so das Knochengewebe vor Abbau durch Chemikalien des Blutes (Auflösung von Kristalliten)<sup>[73]</sup>.

**Osteoklasten** sind für den notwendigen Abbau der Knochengrundsubstanz zuständig. Durch die Freisetzung von sauren Hydrolasen und der Abgabe von Proteinen, kann die organische Matrix abgebaut werden um den Umbau des Knochengewebes zu ermöglichen. Diese knochenabbauenden Zellen haben eine Größe von ungefähr 100 µm und besitzen bis zu hundert Zellkerne. Die Differenzierung zu Osteoklasten wird durch Interaktionen zwischen Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoblasten gesteuert.

**Alkalische Phosphatase (AP)** ist ein Glykoprotein und wird von Osteoblasten und Osteozyten gebildet. Die AP spielt eine wichtige Rolle bei der Kalzifizierung und kann dadurch als Marker für den Knochenstoffwechsel eingesetzt werden. Die mesenchymalen Stammzellen exprimieren geringe Mengen an AP. Das macht es möglich die osteoblastäre Differenzierung über AP als Marker zu verfolgen<sup>[74]</sup>.

**Osteopontin (OP)** ist ein Bestandteil der EZM und kann als Marker für die Zelladhäsion verwendet werden. Es wird am Ende der Proliferation im geringen Maße ausgeschüttet. Osteopontin wird von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten produziert und soll die Kalziumeinlagerung unterstützen<sup>[75-77]</sup>.

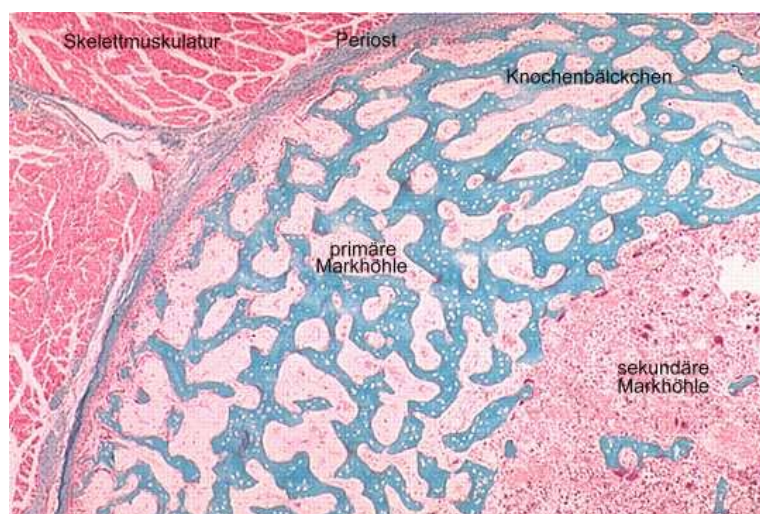


**Osteokalzin (OC)** wird von reifen Osteoblasten synthetisiert und in die EZM eingelagert. Dieses Protein ist für Knochen und Dentin spezifisch und kann als Marker für Knochenumbauprozesse verwendet werden<sup>[74, 78-79]</sup>. Es besteht die Möglichkeit, dass die Differenzierung von Osteoklasten durch Osteokalzin gefördert wird.

**Osteoprotegerin (OPG)** ist ein Glykoprotein und spielt bei der Osteoklastenbildung eine wichtige Rolle. Es kann als Regulator für Knochenumbau und Knochenabbau angesehen werden. Eine erhöhte Expression kann während der osteogenen Differenzierung beobachtet werden<sup>[80]</sup>.

Im Folgenden soll die **Knochenbildung** in den einzelnen Schritten dargestellt werden<sup>[81]</sup>: Vor dem Beginn der Knochenbildung wandern mesenchymale Stammzellen zu der Stelle, wo der Knochenaufbau erfolgen soll. Es wird eine mesenchymale-epitheliale Wechselwirkung ausgebildet, die zur Aggregation der mesenchymalen Zellen führt. Anschließend kommt es zur Proliferation der Osteoprogenitorzellen und der Differenzierung der Präosteoblasten in reife Osteoblasten. Danach kommt es zur Ablagerung der organischen Knochenmatrix mit anschließender Mineralisierung. Zum Schluss erfolgt der Knochenumbau.

Die Knochenbildung kann durch zwei Mechanismen beschrieben werden. Bei der enchondralen Ossifikation (Abbildung 2.19) wird Knorpelgewebe an einer Matrix aus Knorpelgewebe gebildet. Anschließend wird der Knorpel durch Knochen nach und nach ersetzt<sup>[82]</sup>.



**Abbildung 2.19:** Knochenbildung durch enchondrale Ossifikation<sup>[82]</sup>



Bei der desmalen Ossifikation differenzieren agglomerierte mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten und scheiden dabei eine Matrix aus Mucoproteinen und Kollagenfasern ab. In diese Matrix wird Hydroxylapatit eingelagert.

Während den verschiedenen Stadien der Differenzierung werden unterschiedliche Stoffe gebildet, die als spezifische Marker dienen können. In der Proliferationsphase werden hauptsächlich Proteine, wie Kollagen (Typ I), Fibronectin und *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) exprimiert, die für die Matrixbildung notwendig sind<sup>[71]</sup>. Nach der Proliferationsphase kommt es zur Reifung der Matrix, was mit einer fortgeschrittenen Differenzierung verbunden ist. Die Kollagen (Typ I)-Synthese nimmt ab und es kommt zur Expression der alkalischen Phosphatase (AP). Hierbei wird die Matrix auf den Knochenumbau vorbereitet. Während der Mineralisierung kommt es zum maximalen Anstieg der Osteopontin- (OP), Osteokalzin- (OC) und der Kollagenase-Synthese<sup>[83]</sup>.

### 2.2.3.2 Aufbau der Netzhaut

In der Abbildung 2.20 wird der schematische Aufbau des Auges dargestellt<sup>[84]</sup>. Die Netzhaut oder Retina ist eine Schicht von spezialisiertem Nervengewebe an der hinteren Innenseite des Auges<sup>[84]</sup>. In der Retina wird das auftreffende Licht, nachdem es die Hornhaut, die vordere und hintere Augenkammer, die Linse und den Glaskörper durchquert hat, in Nervenimpulse umgewandelt.

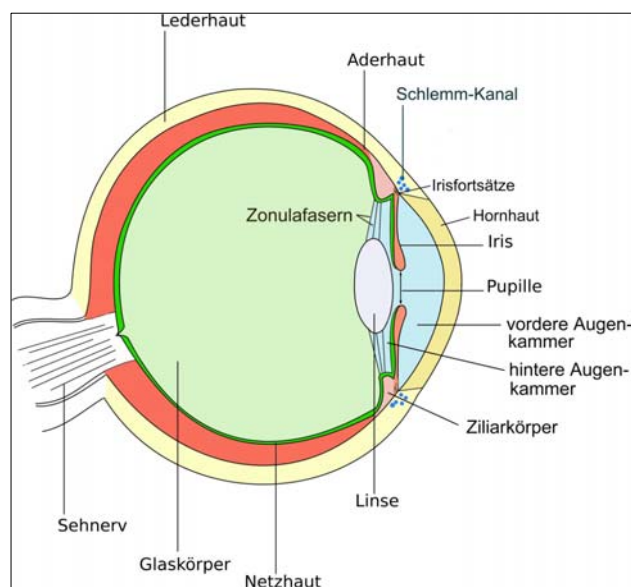


Abbildung 2.20: Schematischer Aufbau des Auges<sup>[84]</sup>

Die Netzhaut besteht aus dem lichtempfindlichen Gewebe, wie Nervenzellen, die zur Verarbeitung und Weiterleitung der erzeugten Impulse dienen. Weiterhin sind verschiedene Strukturen zur Aufrechterhaltung der Funktion der reizerzeugten und –verarbeitenden Zellen notwendig. Die Netzhaut kann in unterschiedliche Schichten eingeteilt werden. Die dem Licht abgewandte Netzhaut ist das Gewebe, welches näher zur Außenwand des Augapfels liegt. Diese wird als *äußere* Netzhaut bezeichnet. Die *innere* Netzhaut entspricht der lichtzugewandten Seite. Das Licht durchläuft die Netzhaut von innen nach außen. Der größte Teil der Innenfläche des Augapfels wird von der *Pars optica retinae* bedeckt, welche Fotorezeptoren trägt. Etwa 3 mm hinter dem Ziliarkörper liegt die *Ora serrata*. Es ist die einzige feste Verbindung zwischen der nicht pigmentierten *Neuroretina* und dem pigmentierten Anteil (retinales Pigmentepithel). Die Netzhaut wird außen von der Aderhaut umschlossen. Der Nährstofftransport findet kontrolliert durch die RPE Zellen statt, welche durch *tight junctions* (eine bestimmte Zell-Zell-Wechselwirkung) einen wasserdichten Verband bilden, ähnlich der Blut-Hirn-Schranke. Im Falle des RPE spricht man von der Blut-Retina-Schranke. Außerdem findet der Gasaustausch statt und die Metaboliten werden abtransportiert. Im Auge liegt die innere Netzhaut auf dem Glaskörper. In der Sehnervenpapille geht die Netzhaut hinten in den Sehnerv über, welcher die Nervenfasern der Ganglienzellen enthält.

Durch die Pupille kann der Augenhintergrund beobachtet und in seinen Einzelheiten erklärt werden (Abbildung 2.21). Zunächst schaut man durch die farblose und durchsichtige Neuroretina hindurch auf das dunkel pigmentierte Retinale Pigmentepithel (RPE) und die darunterliegende Aderhaut. Auf der rechten Seite des Augenhintergrunds kann ein rosa bis hellroter Kreis oder Oval beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um die Austrittsstelle des Sehnervs oder *Papille*.



**Abbildung 2.21:** Ansicht des Augenhintergrunds (Zentral die Makula, rechts Papille)<sup>[84]</sup>

Von der Papille ausgehend sieht man die großen Netzhautgefäße (*Arteriola und Venola centralis retinae*). Die schläfenseitigen Gefäßzweige umrunden bogenförmig ein gefäßarmes und im Zentrum gefäßfreies Gebiet, den „gelben Fleck“ oder *Macula lutea*. Diese hat einen Durchmesser von etwa 3 mm. Im Zentrum der *Macula lutea* befindet sich die *Fovea centralis* oder auch Sehgrube genannt, weil diese eine seichte Vertiefung bildet. An dieser Stelle hat die Netzhaut die größte Auflösung und damit ist es der Ort des schärfsten Sehens. Die umgebende Netzhaut dient im Wesentlichen der Umfeldwahrnehmung, dem Erkennen von Dingen „aus den Augenwinkeln“. Eine schwere Schädigung der *Macula lutea*, z.B. durch die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) führt zur Verlust der Sehschärfe und schließlich zur Erblindung des Patienten. Im nächsten Kapitel wird die Entstehung der AMD genauer beschrieben.

Auf die Darstellung des exakten biologischen Aufbaus der Netzhaut wird an dieser Stelle verzichtet. Hervorgehoben werden nur die wichtigsten Bestandteile der Netzhaut, die für das Verständnis des „Sehens“ wichtig sind. Dies soll anhand eines Netzhautquerschnitts erklärt werden (Abbildung 2.22). Die Netzhaut besteht aus unterschiedlichen Nervenzellen, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Bei den Stäbchen und Zapfen handelt es sich um lichtempfindliche oder fotorezeptive Zellen, welche das eintreffende Licht in Nervenimpulse umwandeln. Bei den Horizontalzellen, den Bipolarzellen und den Amakrinzellen handelt es sich um zwischengeschaltete Zellen oder Interneurone, welche die erzeugten Nervenimpulse aufnehmen, verarbeiten und weiterleiten. Die Ganglienzellen können schließlich die Nervenimpulse zum Sehnerv weiterleiten.

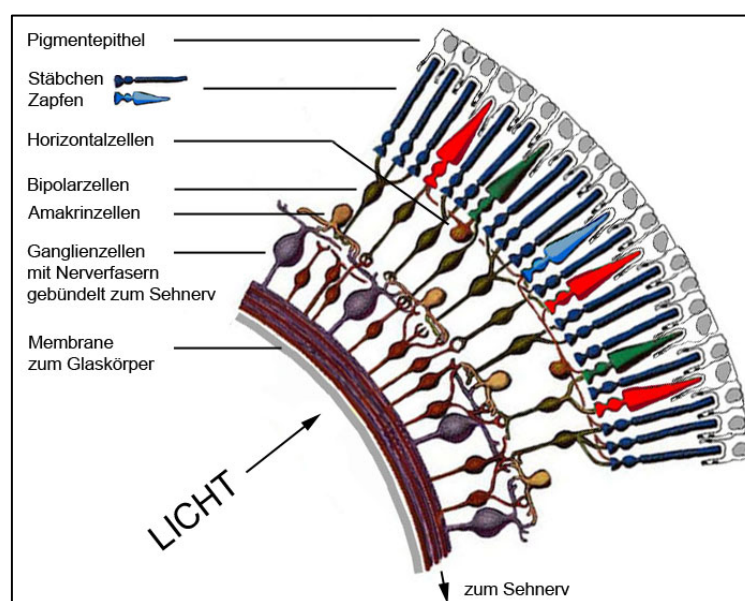


Abbildung 2.22: Querschnitt durch die Netzhaut<sup>[85]</sup>

Das Hauptaugenmerk soll nun auf das hexagonal aufgebaute, einschichtige Pigmentepithel gelegt werden. Das Retinale Pigmentepithel (RPE) liegt ganz außen in der Netzhaut und bildet die Trennschicht zwischen der Netzhaut und der Aderhaut (*Choroidea*). Die Zellen des RPE enthalten durch Melanin schwarz gefärbte Melanosomen, welche funktionell Lichtfilter darstellen. Die umgreifende fingerartigen Fortsätze (Mikrovilli) des RPE sorgen für den Stoffaustausch mit den Nervenzellen. Die RPE-Zellen verhindern ein Eintreten von Blut aus der stark vaskularisierten Grenzschrift der Aderhaut. Die Verbindung zwischen dem RPE und der *Neuroretina* wird nur durch einen vom RPE aktiv erzeugten Sog aufrechterhalten.

#### 2.2.3.2.1 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Unter dem Begriff Makuladegeneration wird eine Gruppe von Erkrankungen des menschlichen Auges zusammengefasst<sup>[86]</sup>. Dabei verliert der „Gelbe Fleck“ oder die *Makula lutea* allmählich die Funktion, die auch zur Erblindung des Patienten führen kann. Der Ausgangspunkt der Krankheit ist jedoch nicht das Nervengewebe selbst, sondern seine Unterstützungsstrukturen, wie das Retinale Pigmentepithel (RPE), die Bruchsche Membran und die Aderhaut<sup>[83]</sup>. Bei fortschreitender Krankheit sterben die Netzhautzellen ab und die Sehfähigkeit im zentralen Gesichtsfeld wird stark beeinträchtigt. Die weitaus häufigste Form der Makuladegeneration ist die Altersabhängige oder Senile Makuladegeneration (AMD), die definitionsgemäß erst nach dem 50. Lebensjahr auftritt. Bei einer immer älter werdenden Bevölkerung in den Industriestaaten nimmt die Häufigkeit der AMD deutlich zu. Die AMD ist die häufigste Ursache für eine Erblindung bei Menschen im Alter von über 50 Jahren<sup>[87]</sup>. So werden in den westlichen Industriestaaten 32 % der Neuerblindungen durch AMD verursacht. Glaukom und diabetische Retinopathie verursachen dagegen jeweils 16 % der Neuerblindungen. Weltweit sind bis zu 30 Millionen Menschen an AMD erkrankt und jährlich kommen ungefähr 500.000 Neuerkrankungen dazu. Allein in Deutschland leiden zwei Millionen Menschen an der Altersabhängigen Makuladegeneration.

Ein Patient mit AMD kann fokussierte Gegenstände nicht mehr deutlich sehen. So kann der Betroffene eine Uhr erkennen, aber nicht die Uhrzeit bestimmen. Da die Erkrankung in der Regel auf die *Makula lutea* beschränkt ist, bleibt das äußere Gesichtsfeld und somit die Orientierungsmöglichkeit der Betroffenen erhalten (Abbildung 2.23B). Auch bei Dunkelheit

sehen die Betroffenen in der Regel relativ gut, da die Stäbchen außerhalb der zentralen Netzhaut funktionstüchtig bleiben.

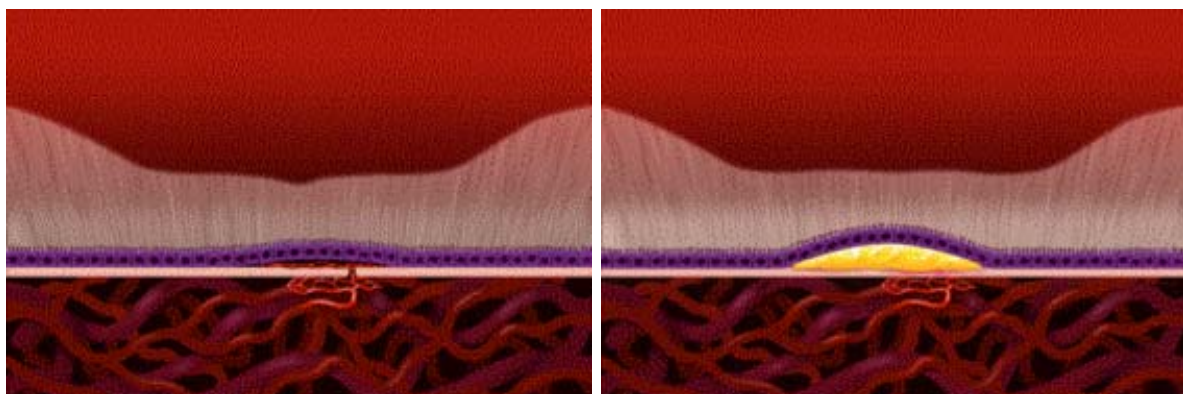


**Abbildung 2.23:** A) Normales Gesichtsfeld B) Gesichtsfeld bei Spätstadium AMD<sup>[88]</sup>

Die Schädigung der *Makula lutea* durch die AMD führt zum folgenden Funktionsverlust:

- Abnahme der Sehschärfe und damit der Lesefähigkeit
- Abnahme des Kontrastempfindens
- Abnahme des Farbsehens
- Abnahme der Anpassungsfähigkeit an veränderte Lichtverhältnisse
- Erhöhung der Blendempfindlichkeit

Die AMD kann in die „trockene“ und „feuchte“ Form eingeteilt werden. Die „trockene“ Form der AMD macht etwa 80 % der Neuerkrankungen aus. Dabei führt der Krankheitsverlauf dieser Form nur zu 5 bis 10 % der Gesamterblindungen an AMD. Wie in den Abbildungen 2.24 zu sehen beginnt die Erkrankung mit Ablagerungen von sogenannten Drusen oder Stoffwechselprodukten zwischen dem Retinalen Pigmentepithel und der Bruch'schen Membran.



**Abbildungen 2.24:** Drusenbildung bei AMD<sup>[88]</sup>

Durch die Störung der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Retinalen Pigmentepithels sterben bei fortgeschrittenem Stadium die Zellen ab und in Folge auch die Photorezeptoren, da diese über die RPE-Zellen nicht mehr versorgt werden können. Für die „trockene“ Form der AMD gibt es keine allgemein akzeptierte Behandlungsform. Die „trockene“ Form der AMD kann in die „feuchte“ Form übergehen. Dabei bilden sich unter der Netzhaut flächige Gefäßmembranen, die zu Blutungen neigen. Einige Therapieoptionen bestehen darin, die Gefäßneubildung aufzuhalten oder die neu gebildeten Gefäße zu zerstören. Bei der photodynamischen Therapie wird ein photosensibilisierender Stoff in die Armvene gespritzt und die Stelle der neugebildeten Gefäßmembran mit einem „kalten“ Laser belichtet. Dadurch kann häufig ein Verschluss der Gefäßmembran erreicht und ein weiterer Sehverfall aufgehalten werden. Ein anderer pharmakologischer Therapieansatz besteht darin Wachstumsfaktoren, die an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt sind, zu hemmen. Dazu werden *Vascular Endothelial Growth Factor* (Anti-VEGF) Antagonisten in den Glaskörper injiziert. Diese Methodik wird zurzeit klinisch erprobt und bereits angewendet. Der Nachteil dieser Methode zeigt sich in den Ergebnissen verschiedener Studien. Es wird berichtet, dass der Sehverlust nur abgebremst, aber nicht aufgehalten wird<sup>[86]</sup>. Nach dem jetzigen Stand müssen diese Injektionen alle 4 Wochen wiederholt werden. Logistisch ist es vor allem für ältere Menschen ein riesiger Aufwand. Außerdem ist diese Methode extrem teuer und mit jeder Spritze ins Auge erhöht sich das Risiko von Komplikationen, z.B. Glaskörperentzündung oder -abhebung. Derzeit laufen Studien, um diese Injektionsintervalle zu verlängern und individuell an den Patienten anzupassen.

Nach aktueller Studienlage zeigt die Makularotation die besten Langzeitergebnisse und stellt damit das chirurgische Verfahren der Wahl dar<sup>[89]</sup>. Durch die Drehung der fovealen Neuroretina wird die Makula auf einen Bereich mit intaktem Pigmentepithel und Aderhaut gebracht. Langfristig verschlechtert sich aber die Sehschärfe, weil eine optimale Rekonstruktion des subretinalen Raums durch die Makularotation nicht erreicht wird.

Ein völlig anderer Ansatz ist es Retinales Pigmentepithel zu transplantieren. Dabei versucht z.B. die Arbeitsgruppe von Frau Professor Thumann der Universitätsaugenklinik Aachen das Tissue Engineering von Pigmentepithelzellen zu etablieren. Im folgenden Abschnitt soll die bisherige Entwicklung zu Zelltransplantationen kurz erläutert werden.

### 2.2.3.2.2 Bisherige Transplantationsversuche zu AMD

Die chirurgische Behandlung der AMD durch Zelltransplantation wurde bereits vor über 25 Jahren entwickelt<sup>[89]</sup>. So führte die Transplantation von RPE- oder IPE-Zellen in Suspension zu keiner Verbesserung der Sehschärfe<sup>[90-92]</sup>. Dies wurde damit begründet, dass die transplantierten Epithelzellen keine geeignete Adhäsionsfläche im subretinalen Raum vorfanden. Weiterhin wurde versucht RPE-Zellverbände mit Bruch'scher Membran oder Aderhaut zu transplantieren, doch auch hier wurde keine signifikante Verbesserung der Sehschärfe erhalten<sup>[93-94]</sup>. Für die Entstehung der AMD wird davon ausgegangen, dass eine genetische Komponente auf RPE-Niveau notwendig ist. Deswegen ist der Erfolg einer autologen RPE-Transplantation limitiert<sup>[95]</sup>. Dagegen kann die Transplantation von autologen IPE-Zellen die Degeneration von Photorezeptoren aufhalten<sup>[52, 96]</sup>, da IPE-Zellen in andere Zelltypen, wie RPE de- und redifferenzieren können<sup>[54, 97]</sup>.

Das Ziel ist es IPE-Zellen auf einem biologisch abbaubaren Substrat zu transplantieren, weil Bestandteile der Basalmembran sowie der Bruch'schen Membran durch AMD zerstört wurden. Eine solche Matrix, z.B. aus extrazellulären Matrix-Proteinen würde den Pigmentepithelzellen erlauben, ihre Differenzierungsmerkmale und Funktionen beizubehalten. Hierzu zählen der Abbau der Matrix sowie die Produktion der physiologischen Bestandteile der Basalmembran und der Bruch'schen Membran. Eine erfolgreiche IPE-Transplantation hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab<sup>[52]</sup>. Es muss eine optimale Anzahl von transplantierten IPE-Zellen auf der Matrix erreicht werden. Die IPE Zellen sollen die Außensegmente, die von den Photorezeptoren täglich abgeschieden werden, aufnehmen und abbauen. Anschließend müssen die RPE-Zellfunktionen durch die transplantierten IPE-Zellen übernommen werden, z.B. kontrollierter Stofftransport zwischen Netzhaut und Aderhautblutgefäßen.

Auf der Suche nach der optimalen Matrix wurde von G. THUMANN et al<sup>[98-99]</sup> das Adhäsions-, Proliferations-, Differenzierungs- und Vitalitätsverhalten von RPE- und IPE-Zellen auf einer Kollagen(Typ I)-Membran untersucht. Dabei wurde ein konfluentes Besiedeln der Zellen auf dieser Matrix festgestellt und die prinzipielle Eignung als Substrat für Zellen und als transplantierbares Material nachgewiesen. Um die EZM noch besser nachzubilden wurde eine Kooperation zwischen der AG Thumann und AG Wendorff begonnen. Das Ziel ist es, Nanofasern als eine mögliche Matrix zu etablieren und die gewünschten Eigenschaften noch besser einzustellen. Die Vorteile einer Matrix aus Nanofasern werden im nächsten Kapitel dargestellt.



## 2.3 Elektrogesponnene Fasern im Tissue Engineering

Für die *in vitro* Gewebezüchtung wird eine biokompatible oder bioabbaubare Matrix benötigt, die als Leitstruktur für die Zellen dient. Die Matrix darf keine cytotoxische Eigenschaften haben. Weiterhin ist die Porosität einer Matrix für das Gewebewachstum und Vaskularisierung essentiell. Für die Proliferation und Differenzierung sind weitere Faktoren entscheidend, wie die chemische Zusammensetzung der Oberfläche, die Oberflächenladung, die Topologie oder Rauheit der Matrixoberfläche und die geometrische Konfiguration. Weitere Faktoren sind die Benetzbarkeit, die Sterilisierbarkeit und die Möglichkeit, eine dreidimensionale Matrix gezielt einzustellen. Auch die mechanischen Eigenschaften eines *Scaffolds* müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen.

In den letzten Jahren haben sich elektrogesponnene Polymerfasern als Ersatz für die extrazelluläre Matrix als viel versprechend erwiesen. Nanofasern können aufgrund ihrer geringen Masse und dem hohen Aspektverhältnis zur Verbesserung der Zellbesiedlung führen. Durch die faserige Struktur der Nanofasern wird die faserige Struktur der EZM stark imitiert. Außerdem besteht eine Fülle von Möglichkeiten die Morphologie und die Funktionalität der Fasern auf die gewünschten Eigenschaften gezielt einzustellen.

So können elektrogesponnene Fasern aus einer Vielzahl an Polymeren erzeugt werden<sup>[4]</sup>. In den Arbeiten von R. DERSCH<sup>[8]</sup> wurden gleich mehrere bioabbaubare Polymere, wie Poly(L-lactid), Poly(DL-lactid), Poly(DL-lactid-co-caprolacton), Poly(DL-lactid-co-glycolid), Poly( $\epsilon$ -caprolacton) und Poly(3-hydroxybuttersäure-co-3-hydroxyvaleriansäure) zu Fasern versponnen und die Matriceigenschaften getestet. So können die Oberflächeneigenschaften und die mechanische Eigenschaften durch das verwendete Polymer eingestellt werden. Im Bereich der regenerativen Medizin sind die Oberflächeneigenschaften wie die Bioverträglichkeit und die Bioresorbierbarkeit einer Matrix von entscheidender Bedeutung. Deswegen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von neuen bioabbaubaren und biokompatiblen Polymeren synthetisiert und zu Nanofasern verarbeitet. Außerdem wurden schon vorhandene Biopolymere (Proteine) zu Fasern versponnen und nach ihrer Eignung als *Scaffolds* untersucht. Dazu gehören Kollagen<sup>[100-102]</sup>, Gelatine<sup>[101, 103]</sup>, Fibrinogen<sup>[104]</sup> und Chitosan<sup>[105]</sup>. Weitere bioabbaubare Polymere, wie Cellulose<sup>[106-107]</sup>, Celluloseacetat<sup>[108]</sup>, Polylactid<sup>[109-111]</sup>, Poly( $\epsilon$ -caprolacton)<sup>[112-114]</sup>, Polyglycolid<sup>[115-116]</sup> und Polyesterurethan<sup>[117-120]</sup> wurden zu Fasern verarbeitet und die bioabbaubaren Eigenschaften untersucht. In einigen Untersuchungen wurde versucht die Matriceigenschaften zu kombinieren. So wurden auch



Copolymere wie Poly(lactid-*co*-glycolid)<sup>[116, 121-124]</sup> und Poly(L-lactid-*co*- $\epsilon$ -caprolacton)<sup>[125-127]</sup> zu Fasern verarbeitet.

Weitere Möglichkeiten, um die Oberflächeneigenschaften bzw. die mechanische Eigenschaften zu modifizieren, ist die Verwendung von Polymer-Blends. Diese wurden zu Fasermatrizes durch das Elektrosponnen generiert. Beispiele dafür sind Blends von Polylactid/Poly(ethylen-*co*-vinylacetat)<sup>[111]</sup>, Polyglycolid/Chitin<sup>[128]</sup>, Polylactid/Chitosan<sup>[129]</sup>, Poly( $\epsilon$ -caprolacton)/Kollagen<sup>[130-132]</sup>, Poly(L-lactid-*co*- $\epsilon$ -caprolacton)/Kollagen<sup>[133-134]</sup>, Poly( $\epsilon$ -caprolacton)/Gelatine<sup>[103]</sup> und Poly(3-hydroxybutyrat-*co*-3-hydroxyvalerat)/Kollagen<sup>[135]</sup>. Proteine wie das Kollagen sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und kommen deshalb häufig zur Anwendung. Die Verwendung von Polymer-Blends mit Proteinen der EZM führen zur Verbesserung der Oberflächeneigenschaften. Dagegen nimmt die Qualität der mechanischen Eigenschaften deutlich ab. Da die *Scaffolds* in wässrigem Milieu eingesetzt werden kommt es zur Verfilmung der Fasern und einem Herauslösen der Proteinkomponente. Die Stabilität einer Matrix ist jedoch essential für die Zelleitstruktur und muss je nach Anwendungen einige Tage bis Wochen bestehen bleiben. Außerdem spielt der E-Modul und die Dehnung eine wichtige Rolle. Dieses nimmt ebenfalls bei den Polymer/Protein-Blends ab. Um dieses Problem zu umgehen wurden Proteinbeschichtungen von Polymerfasern durchgeführt. Dabei können die guten mechanischen Eigenschaften von Polymerfasern erhalten und die Oberflächeneigenschaften stark verbessert werden. So wurden Proteinbeschichtungen durch Eintauchen in eine Kollagenlösung vorgenommen<sup>[113, 136]</sup>. Dieses Verfahren ist nur bedingt geeignet, da die Physiosorption von Proteinen an der Polymeroberfläche nicht stark genug ist um das Protein dauerhaft an die Oberfläche zu binden. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die es zum Ziel haben die Polymeroberfläche zu funktionalisieren.

### 2.3.1 Oberflächenfunktionalisierte Fasern durch Plasmabehandlung

Polymeroberflächen können durch eine Vielzahl von Methoden funktionalisiert werden. Dazu zählen z.B. die Hydrolyse<sup>[137-138]</sup>, Ozonolyse<sup>[139]</sup>, Aminolyse<sup>[140-141]</sup>, Oxidation<sup>[138]</sup>, Elektronenstrahl-Lithografie<sup>[142-143]</sup> und die UV-Bestrahlung<sup>[138]</sup>. Weiterhin können Wirkmoleküle an der Polymeroberfläche physikalisch angereichert werden<sup>[144-149]</sup>. Jedoch hat

sich im Bereich der Oberflächenfunktionalisierung eine physikalische Methode, die Plasmabehandlung, sehr stark etabliert<sup>[150-155]</sup>.

Das Plasma besteht aus freien Ladungsträgern, wie Ionen oder Elektronen und Radikalen<sup>[156]</sup>. Der Plasmazustand wird als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Charakteristisch für Plasmen ist ihr typisches Leuchten (Abbildung 2.25), das durch Strahlungsemission angeregter Gasatome, Ionen oder Moleküle verursacht wird<sup>[157]</sup>. In der Werkstofftechnik werden Plasmen zur Oberflächenmodifizierung (Aufräumen oder Glätten) zur plasmainduzierten Materialabscheidung, z.B. Plasmapolymerisation, zur Oberflächenhärtung, zur Reinigung oder Plasmaoxidation eingesetzt. Es gibt höchst unterschiedliche Formen von Plasmen. Zur Unterscheidung von Plasmen wird der Druck des Gases, in welchem sich die ionisierten Spezies befinden, herangezogen. Es kann unterschieden werden zwischen Niederdruckplasmen, Normaldruckplasmen und Hochdruckplasmen.

Bei der Oberflächenfunktionalisierung reagieren die gebildeten Radikale mit der Polymeroberfläche. Dabei werden Radikale auf der Polymeroberfläche erzeugt, die z.B. mit atomarem Sauerstoff reagieren können. Dabei werden an der Polymeroberfläche die Bindungen innerhalb des Polymers gespalten und so funktionelle Gruppen erzeugt. Die Spaltung der Polymerketten an der Oberfläche führt zur Abnahme des Molekulargewichts. Da die Materialabtragung durch Plasma nur wenige Nanometer beträgt werden die mechanischen Eigenschaften des Polymers kaum verändert.



**Abbildung 2.25:** Niederdruckplasma durch elektromagnetische Entladung<sup>[157]</sup>

Zur Plasmaerzeugung können unterschiedliche Gase verwendet werden, die zu unterschiedlichen funktionellen Gruppen führen. So können Sauerstoff, Argon und Ammoniak zur Plasmaerzeugung eingesetzt werden.

Für den *Scaffold*-Einsatz im Tissue Engineering kann eine Plasmabehandlung von Fasern zu vielfach gewünschten Oberflächeneigenschaften führen. So kann die Polymeroberfläche aktiviert und eine Oberfläche höherer Oberflächenenergie erzeugt werden<sup>[158]</sup>. Eine Faseroberfläche mit hoher Oberflächenenergie kann von Materialien geringerer Oberflächenenergie bedeckt werden, die Fähigkeit zur Benetzung steigt. Somit können sich auch Proteine der extrazellulären Matrix besser an eine aktivierte Oberfläche anlagern und die Biokompatibilität erhöhen.

Die Plasmabehandlung von Fasern aus Polystyrol<sup>[159]</sup>, Poly(lactid-*co*-glycolid)<sup>[160]</sup>, Polyglycolid<sup>[161]</sup>, Poly(3-hydroxybutyrat-*co*-3-hydroxyvalerat)<sup>[162]</sup>, Seidenfibroin<sup>[163-164]</sup> und Poly( $\epsilon$ -caprolacton)<sup>[165-166]</sup> führten zu verbesserten Oberflächeneigenschaften für das Zellwachstum. Durch die Wirkung von Sauerstoff-, Argon-, Ammoniak<sup>[160-161]</sup> - und Methanplasma<sup>[164]</sup> konnten unterschiedliche polare Gruppen auf der jeweiligen Polymeroberfläche eingeführt werden. So führt die Sauerstoff- oder Argonplasmabehandlung der Polymeroberflächen zu Erhöhung des Sauerstoffgehalts. Durch die röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie konnten neu gebildete Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen nachgewiesen werden<sup>[159-161, 164, 166]</sup>. Durch die Ammoniakplasmabehandlung können Amingruppen auf der Polymeroberfläche eingeführt werden<sup>[160-161]</sup>. Durch diese funktionellen Gruppen nimmt die Oberflächenpolarität zu. Kontaktwinkelmessungen zeigten mit der Zunahme der Plasmabehandlungszeit eine starke Zunahme der Oberflächenhydrophilie<sup>[159-161, 164-166]</sup>. Unterschiedliche Zelltypen, wie die Fibroblasten<sup>[160, 164, 166]</sup>, Chondrocyten<sup>[163, 166]</sup>, Osteoblasten<sup>[166]</sup>, Keratinozyten<sup>[164]</sup> und Schwann-Zellen<sup>[165]</sup>, zeigten eine Verbesserung der Zelladhäsion<sup>[159-160, 163-164, 166]</sup>, Proliferation<sup>[160, 162-163, 165-166]</sup> und Differenzierung<sup>[163]</sup>. Die cytotoxischen Eigenschaften wurden vielfach untersucht<sup>[162-163, 166]</sup>. Dabei nahm die Vitalität in der Regel im Vergleich zu den unbehandelten Faserproben zu. Auch die Topografie oder Rauigkeit konnte modifiziert werden<sup>[166]</sup>. Durch die Plasmabehandlung von Fasern mit unterschiedlichen Faserdurchmessern konnten die „dünnen“ Fasern geschmolzen und so selektiv von der Oberfläche entfernt werden<sup>[166]</sup>. Zusammenfassend kann verdeutlicht werden, dass durch die Plasmabehandlung von Polymernanofasern:

- an der Polymeroberfläche polare funktionelle Gruppen gebildet werden<sup>[159-161, 164-166]</sup>
- die Oberflächenladung stark zunimmt<sup>[159-166]</sup>
- die Oberflächenhydrophilie und damit die Benetzbarkeit vergrößert wird<sup>[159-166]</sup>
- die Topografie der Fasermatrizes eingestellt werden kann<sup>[163, 166]</sup>

- die Porosität (zwischen „dünnen“ Fasern) an der Oberfläche vergrößert wird<sup>[163, 166]</sup>
- die mechanischen Eigenschaften, wie die Dehnbarkeit und die Bruchdehnung kaum beeinflusst werden<sup>[165]</sup>
- die Cytokompatibilität verbessert wird<sup>[162-163, 166]</sup>
- die Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit der *Scaffolds* verstärkt wird<sup>[160]</sup>
- die Zellmigration in das *Scaffold* verbessert wird<sup>[163]</sup>
- das Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Zellen verbessert wird<sup>[159-166]</sup>

Zur Verstärkung der Oberflächenhydrophilie wurde in weiteren Arbeiten<sup>[167-169]</sup> die Polymerfaseroberfläche durch Plasma aktiviert und mit Acrylsäure *in situ* polymerisiert. Dazu wurden Fasern aus Poly(L-lactid)<sup>[167-168]</sup>, Polyglycolid<sup>[168]</sup>, Poly(lactid-co-glycolid)<sup>[168]</sup> und Polyurethan<sup>[169]</sup> mit Sauerstoffplasma behandelt und gleichzeitig Acrylsäure in die Plasmakammer geleitet. Durch die Plasmabehandlung entstehen wie oben beschrieben Radikale an der Polymeroberfläche. Diese reagieren mit dem Monomer Acrylsäure und bilden so Carboxylgruppen an der Polymeroberfläche. Diese hydrophilisierte Polymeroberfläche absorbiert viel stärker Proteine als die unveränderte Oberfläche<sup>[169]</sup>. Fibroblasten<sup>[167-168]</sup> und humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)<sup>[169]</sup> wurden auf diese oberflächenfunktionalisierte Matrices ausgesät und deren Adhäsions- und Proliferationsverhalten untersucht. Leider wurde in diesen Arbeiten der Unterschied zwischen einer plasmabehandelten hydrophilen Polymeroberfläche und einer durch Acrylsäure hydrophilisierten Polymeroberfläche nicht untersucht, so dass keine Verbesserung oder Verschlechterung dieser Methode aufgezeigt werden kann. So führt die durch Acrylsäure hydrophilisierte Polymeroberfläche, ähnlich der plasmabehandelten hydrophilen Polymeroberfläche dazu, dass

- auf der Polymeroberfläche Carboxylgruppen eingeführt werden<sup>[167-169]</sup>
- die Cytokompatibilität verbessert wird<sup>[167-169]</sup>
- die Oberflächenhydrophilie und damit die Benetzbarkeit vergrößert wird<sup>[167-169]</sup>
- die mechanischen Eigenschaften, wie die Dehnbarkeit und die Bruchdehnung kaum beeinflusst werden<sup>[167-169]</sup>
- das Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Zellen verbessert wird<sup>[167-169]</sup>
- die Zellmigration in das *Scaffold* verbessert wird<sup>[169]</sup>
- die Permeabilität und dadurch der Nährstofftransport der Zellen verbessert wird<sup>[169]</sup>

### 2.3.2 Protein- und Mineralfunktionalisierte Fasern nach Plasmabehandlung

Durch die Plasmabehandlung der Polymeroberfläche werden neue funktionelle Gruppen gebildet. Diese Gruppen können zur Anbindung unterschiedlicher Proteine und Mineralien der extrazellulären Matrix verwendet werden. So wurden Fasern aus Poly( $\epsilon$ -caprolacton)<sup>[170, 172, 175-176]</sup>, Poly(L-lactid)-*co*-Poly( $\epsilon$ -caprolacton)<sup>[171, 173]</sup>, Polyethersulfon<sup>[174]</sup> mit Plasma behandelt und Carboxylgruppen initiiert. Diese wurden teilweise mit Kopplungsreagenzien, wie Carbodiimid<sup>[170, 172, 174]</sup> und *N*-hydroxysuccinimid<sup>[170, 174]</sup> aktiviert und mit Gelatine<sup>[170]</sup> oder Kollagen(Typ I)<sup>[171-174]</sup> kovalent gebunden. Ionische Bindungen wurden mit Kalziumphosphat<sup>[175]</sup> und Hydroxyapatit<sup>[176]</sup> realisiert. Durch die röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie konnte eine erfolgreiche Anbindung der Proteine nachgewiesen werden<sup>[170-172]</sup>. Durch Röntgenbeugungsexperimente konnte die Mineralisierung der Faserpolymeroberfläche bestimmt werden<sup>[175]</sup>. Endothelzellen<sup>[170-171, 173]</sup>, Fibroblasten<sup>[172]</sup>, Stammzellen<sup>[174]</sup> und Osteoblasten<sup>[176]</sup> wurden auf diese Matrices ausgesät und das Adhäsions- und Proliferationsverhalten untersucht. Die Anbindung von Proteinen und Mineralien an die Faseroberfläche führte ähnlich wie die schon beschriebenen Oberflächenverfahren dazu, dass

- die Oberflächenhydrophilie und damit die Benetzbarkeit stark vergrößert wird (Kontaktwinkel bei 0°)<sup>[170, 172, 174-176]</sup>
- das Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Zellen stark verbessert wird<sup>[170-176]</sup>
- die Cytokompatibilität der Zellen vergrößert wird<sup>[171-172]</sup>
- die Zellmigration in das *Scaffold* verbessert wird<sup>[172, 174]</sup>

In den Untersuchungen fehlt insgesamt ein Vergleich des Zellverhaltens auf einer plasmabehandelten hydrophilen, einer durch Acylsäure hydrophilisierten und einer proteinbeschichteten Polymeroberfläche. Deswegen ist es an dieser Stelle unmöglich zu sagen, welche der Methoden das Optimum darstellt.

### 2.3.3 RGD-Peptidfunktionalisierte Fasern im Tissue Engineering

Im Abschnitt 2.2.2.2 „Zellmembran und Integrin-Rezeptoren“ wurde die RGD-Aminosäuresequenz auf der Oberfläche der extrazellulären Matrix beschrieben. Diese Erkennungssequenz ist für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion verantwortlich. Vergleichbar ist dieser Mechanismus mit dem Schlüssel-Schloß-Prinzip beim enzymatischen Abbau. Nur bestimmte Substrate mit der richtigen Stereochemie gelangen in das „aktive“ Zentrum des Enzyms. Enzyme können auf diesem Wege auch inhibiert werden.

Peptide mit einer RGD-Sequenz werden Zelladhäsionspeptide genannt. Wie schon beschrieben findet man die RGD-Sequenzen in unterschiedlicher Anzahl und Konformationen in Kollagen, Fibronectin, Laminin, Osteopontin, Vitronectin und Fibronogen. Die RGD-Sequenz besteht aus den drei Aminosäuren: Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Es sind auch weitere Zelladhäsionssequenzen bekannt wie die YIGSR-Sequenz<sup>[177]</sup> und REDV-Sequenz<sup>[178]</sup>. Die YIGSR-Aminosäuresequenz findet man z.B. in Laminin. Diese besteht aus den fünf Aminosäuren: Tyrosin, Isoleucin, Glycin, Serin und Arginin. Die REDV-Aminosäuresequenz ist ein Bestandteil von Fibronectin und bindet an den  $\alpha_4\beta_1$ -Integrinrezeptor von Endothelzellen<sup>[178]</sup>. Sie besteht aus den Aminosäuren Arginin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Valin.

Eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion kann wie folgt beschrieben werden: Bei der Annäherung einer Zelle an die extrazelluläre Matrix werden vereinzelt Bereiche fester Adhäsion zwischen Integrin-Rezeptoren der Zelle und der Plasmamembran (Kollagen) der extrazellulären Matrix ausgebildet<sup>[177]</sup>. Extrazellulär binden die Rezeptoren an die Adhäsionsproteine. Intern binden die Rezeptoren der Zelle an cytoplasmatische Proteine, wie Vinculin und Talin<sup>[177]</sup>.

Für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion ist die richtige Aminosäuresequenz, z.B. RGD erforderlich. Andere Aminosäuren vom Rest des Proteins sind für diese Bindungsart nicht notwendig. S. P. MASSIA und J. A. HUBBELL<sup>[179-181]</sup> konnten schon im Jahr 1990 RGD-Peptide auf Glass immobilisieren. So zeigten Fibroblasten bei einer RGD-Konzentration von  $1 \text{ fmol/cm}^2$  auf der Glasoberfläche die höchste Adhäsionsrate. Die RGD-Konzentration auf der Matrixoberfläche hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Zelladhäsion. Es wurde weiterhin festgestellt, dass der maximale Abstand zwischen den einzelnen RGD-Peptiden auf der Oberfläche 440 nm betragen kann, um noch eine Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Zelladhäsion zu erhalten. Es ist bekannt, dass die Abstände zwischen den RGD-Sequenzen der Zelladhäsionsproteine, wie z.B. Vitronectin im Bereich von 15 bis 30 nm liegen<sup>[181]</sup>.

Deswegen sollte die Anbindung der RGD-Peptide auf der *Scaffoldoberfläche* im gleichen Abstand erfolgen. Einen großen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Zelladhäsion hat, neben der RGD-Konzentration, die RGD-Konformation. Dabei unterscheidet man zwischen linearen und cyclischen RGD-Peptiden. Cyclische RGD-Peptide sind in ihrer konformationellen Flexibilität eingeschränkt. Es wurde festgestellt, dass dies zu einer 10-fachen Erhöhung der Affinität zum Vitronektin-Rezeptor führt, dagegen zur einer Abnahme der Affinität zum Fibronektin-Rezeptor<sup>[182]</sup>. Eine grosse Rolle spielen auch benachbarte Aminosäuren in RGD-Peptiden. Durch Austausch dieser Aminosäuren kann das RGD-Peptid aktiviert oder inhibiert werden<sup>[182]</sup>.

In weiteren Arbeiten wurden RGD-Sequenzen in Form kurzkettiger Peptide an unterschiedlichsten Substraten immobilisiert. So wurden lineare RGD-Peptide auf Poly(L-lactid)-Filmen angebunden<sup>[137, 139, 150, 152-155]</sup>. Die Bildung von funktionellen Gruppen wurde durch Hydrolyse<sup>[137]</sup>, Ozonolyse<sup>[139]</sup> und Plasmabehandlung<sup>[150, 152-155]</sup> erreicht. Unterschiedliche RGD-Peptide wurden auch auf Polymeroberflächen von Fasern immobilisiert<sup>[183-189]</sup>. Dabei wurden funktionelle Gruppen auf der Faseroberfläche mit verschiedenen Methoden gebildet. So wurde ein Polymerblend aus Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid) und Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid)-*b*-Polyethylenglykol-NH<sub>2</sub> gebildet und zu Fasern versponnen<sup>[183]</sup>. Der Nachweis der Aminogruppen erfolgte mit einem aminreaktiven Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescamin). Die Aminogruppen auf der Polymeroberfläche wurden anschließend mit dem Kopplungsreagenz Ethylenglycol-bis(sulfosuccinimidylsuccinat) aktiviert und mit einem GRGDY-Peptid immobilisiert. Fibroblasten wurden auf diese RGD-funktionalisierten Fasern ausgesät und das Adhäsions- und Proliferationsverhalten untersucht. Es wurde beobachtet, dass in den ersten drei Tagen die Anzahl der adhären und proliferierten Fibroblasten auf RGD-funktionalisierten Fasern signifikant höher ist. Ab dem fünften Tag wurde kein Unterschied zu den unmodifizierten Matrices festgestellt. Es wird davon ausgegangen, dass das Ausbreiten der Zellen durch den Kontakt-Inhibitionsmechanismus gestoppt wurde. Fibroblasten breiten sich solange auf den *Scaffold* aus, bis eine Monoschicht gebildet wird und das weitere Zellwachstum durch die Zell-Zell-Wechselwirkung inhibiert wird.

In einer Arbeit von H. HOSSEINKHANI et al<sup>[184]</sup> wurde das Zelladhäsions-, Proliferations- und das osteogene Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen (Wistar-Rate) auf selbst assemblierten peptid-amphiphilen Nanofasern untersucht. Dabei wurde im synthetisierten Peptid eine RGD-Sequenz eingebaut. Die Aktivität der Osteoblasten wurde durch die Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) bestimmt. Auch der

Osteokalzingehalt diente zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der Zellen. Die mesenchymalen Stammzellen zeigen ein signifikant höheres Zelladhäsionsverhalten, eine höhere ALP-Aktivität und einen höheren Osteokalzingehalt auf Nanofasern mit einer RGD-Sequenz als auf Nanofasern ohne eine RGD-Sequenz.

S.-Y. GU et al.<sup>[185]</sup> synthetisierte in seiner Arbeit ein neues bioabbaubares Polymer Poly(lactid-*co*-glycolid-*co*-lysin) (PLGAL) und koppelte an die Aminosäure (Aminogruppe) ein RGD-Peptid an. Anschließend wurde das schlecht zu verspinnende PLGAL-RGD mit Poly(lactid-*co*-glycolid) verblendet und elektroversponnen. Fibroblasten zeigten ein verbessertes Adhäsions- und Proliferationsverhalten auf diesem *Scaffold*.

In der Arbeit von D. GRAFAHREND et al.<sup>[186]</sup> wurde ein RGD-Peptid an Poly(ethylenglycol)-*block*-poly( $\epsilon$ -caprolacton) gekoppelt. Das GRGDS-Peptid wurde dabei kovalent an das Poly(ethylenglycol)-Segment gebunden. Anschließend wurde das RGD-funktionalisierte Polymer zu Fasern versponnen. Die ausgesäten Fibroblasten zeigten eine hohe Zellviabilität und ein besseres Adhäsionsverhalten.

Weitere Immobilisierungsversuche von RGD-Peptiden auf Polymerfasern wurden von W. S. CHOI et al.<sup>[187]</sup> unternommen. Dabei wurden zunächst Fasern auf Polyurethan elektroversponnen und anschließend ein Polyethylenglycol-Spacer chemisch angebunden. Das GRGDS-Peptid wurde schließlich mit Kopplungsreagenzien wie Carbodiimid und *N*-hydroxysuccinimid auf der Faserpolymeroberfläche immobilisiert. Humane Endothelzellen wurden ausgesät und eine hohe Zunahme der Viabilität und Proliferation der Zellen festgestellt.

In weiteren Arbeiten von D. GRAFAHREND et al.<sup>[188]</sup> wurde das GRGDS-Peptid an Poly(ethylenglycol)-*block*-poly(D,L-lactid) gekoppelt und anschließend zu Fasern versponnen. Fibroblasten zeigten nach 24 Stunden eine 100 % Viabilität und ein sehr gutes Adhäsionsverhalten auf den RGD-funktionalisierten Fasern.

Schließlich bestätigten W. MATTANAVEE et al.<sup>[189]</sup> die positiven Adhäsionseigenschaften von RGD-Peptiden auf Polymerfaseroberflächen. Dazu wurden Polycaprolactonfasern durch Aminolyse aktiviert und mit Kollagen (Typ I) oder GRGDS-Peptiden immobilisiert. Verschiedene Zelltypen, wie Keratinozyten, Fibroblasten und Osteoblasten wurden auf den Matrices ausgesät. Die Immobilisierung mit Kollagen (Typ I) verbesserte das Adhäsions- und Proliferationsverhalten von den Fibroblasten etwas stärker als die Immobilisierung mit den GRGDS-Peptiden. Bei den Keratinozyten war die Funktionalisierung mit GRGDS-Peptiden deutlich besser für das Adhäsions- und Proliferationsverhalten als die Funktionalisierung mit Kollagen (Typ I). Bei den Osteoblasten gab es keinen wesentlichen Unterschied im



Adhäsions- und Proliferationsverhalten auf den Kollagen (Typ I)- und GRGDS-Peptid-funktionalisierten Fasern.

Diese obere Untersuchung zeigt, dass neben der notwendigen RGD-Konzentration auf der Faseroberfläche eine richtige Konformation der RGD-Sequenz benötigt wird. Dabei unterscheiden sich die Integrin-Rezeptoren von Zelle zu Zelle und nicht jede RGD-Sequenz in Form von kurzen Peptiden oder im Protein führt zur gleichen Verbesserung der Adhäsions- und Proliferationseigenschaften. Für eine qualifizierte Aussage zur RGD-Integrinvermittelten Matrix-Zell-Bindung sollten die RGD-Konzentration und der Abstand zwischen den RGD-Sequenzen auf der Faseroberfläche bestimmt werden. Außerdem sollte die RGD-Konformation im Peptid oder Protein vor und nach der Anbindung an die Oberfläche bestimmt werden. Es sollte festgestellt werden ob eine Anbindung der RGD-Einheit die RGD-Stereochemie derartig verändert, dass eine Aktivierung oder Inhibitorung erfolgt. Das Ziel sollte es weiterhin sein, nur dort RGD-Sequenzen zu verwenden, wo sie auch wirklich gebraucht werden, nämlich an der Faseroberfläche und nicht innerhalb der Faser.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Oberflächenfunktionalisierte Fasermatrices für den Einsatz im Bone Tissue Engineering

#### 3.1.1 Motivation und Zielsetzung

Die Arbeiten von R. DERSCH<sup>[8]</sup> und M. RUDISILE<sup>[69]</sup> haben, in enger Zusammenarbeit mit der Orthopädie Marburg, ein anwendbares System für die *in vitro* Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen auf Basis von Poly(L-lactid)-Fasermatrices ergeben. Während es das Ziel von R. DERSCH war, anhand von Modellsystemen den Umgang mit elektrogesponnenen Fasern für den Einsatz als Matrixmaterial zur Zellzüchtung zu etablieren, konnte M. RUDISILE an diese Arbeit anknüpfen. So wurde versucht, den Wachstumsfaktor *Bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) aus Poly(L-lactid)-Fasern in der Zellkultur freizusetzen. Bei der Kultivierung von hMSC konnte ein osteoinduktiver Effekt des Wachstumsfaktors beobachtet werden, obwohl keine Freisetzung beobachtet wurde. Weiterhin wurde auch die Porengröße der Fasermatrices untersucht. Es wurden auch Anstrengungen unternommen, die chemische Zusammensetzung der Oberfläche der Fasern durch das Verblenden von Poly(L-lactid) und Kollagen zu verändern. Es sollte so Einfluss auf das Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Stammzellen genommen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die Oberflächeneigenschaften von Fasermatrices gezielt einstellen zu können. Die Faseroberfläche steht im unmittelbaren Kontakt mit der Zelloberfläche und entscheidet über den Verlauf der bereits beschriebenen Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Deswegen soll versucht werden die Faseroberfläche hinsichtlich vorteilhafter Oberflächeneigenschaften für die Zell-Matrix-Wechselwirkung einzustellen. So sollen zunächst RGD-Peptide an der Faseroberfläche ohne Veränderung der Polymerstruktur angereichert werden. Im zweiten Ansatz sollen zyklische RGD-Peptide mit eingeschränkter Konformationen an der Fasermatrix angebunden werden, um das Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen zu verbessern.

Folgende Fasermatrixeigenschaften sollten dadurch verbessert werden:

- Erhöhung der Biokompatibilität
- Gute mechanische Eigenschaften in Kombination mit sehr guten Oberflächeneigenschaften für das Zellwachstum

Das langfristige Ziel ist es hierbei eine Matrix aufzubauen, die mit autologem Material eine Nachzüchtung von Knochenmaterial ermöglicht und damit eine Reparatur von durch Erkrankung oder Verletzung zerstörtem Knochen erlaubt. Die Arbeiten zur Zellzüchtung wurden in enger Zusammenarbeit mit der Orthopädie und Unfallchirurgie Marburg durchgeführt. Insbesondere sind hier Priv.-Doz. Dr. med. M. Schofer, S. Bockelmann, Dr. rer. nat. J. R. J. Paletta und Univ.-Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann zu nennen.

### **3.1.2 Entwicklung einer Poly(L-lactid)matrix mit angereicherten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche für die *in vitro* Zellkultivierung**

Durch die Entwicklung einer synthetischen Poly(L-lactid)fasermatrix mit funktionalisierter Oberfläche durch die direkte Einbringung von linearen und zyklischen RGD-Peptiden wird eine Verbesserung der Adhäsion, des Wachstums und der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) angestrebt. Dazu soll lineares und zyklisches RGD-Peptid in Form einer Poly(L-lactid)/RGD-Emulsion und einer Poly(L-lactid)/RGD-Suspension in diese Polymerfaser eingebracht werden. Die Umsetzung dieses Ansatzes basiert auf den beiden Besonderheiten beim Poly(L-lactid)-Elektrospinnen: Erstens sind die schwachen Proteinfreisetzungseigenschaften des PLLA zu nennen<sup>[1, 2]</sup>. Zweitens wird berichtet, dass sich hydrophile Verbindungen an der Faseroberfläche während des Elektrospinnprozesses anreichern<sup>[3]</sup>. Vorausgesetzt, dass das Einbringen der RGD-Peptide in die zu verspinnende Lösung keinen Einfluss auf die Fasermorphologie hat, sollte die große Oberfläche und die poröse Struktur von PLLA-Fasern den Kontakt zwischen den RGD-Peptiden und den dazugehörigen Integrin-Rezeptoren der Zellen ermöglichen. Auf diesen RGD-funktionalisierten Fasermatrizes sollen hMSC ausgesät und über eine Zellkulturdauer von 28 Tagen unter Wachstumsbedingungen kultiviert und analysiert werden. Aufgrund des unterschiedlichen Einbringens der RGD-Peptide in die Faser wird davon ausgegangen, dass

sich die Peptid-Verteilung innerhalb der Fasernstruktur ändert. Durch die Anreicherung des RGD-Peptids an die Faseroberfläche wird erhofft, dass sich das RGD-Peptid in seiner bioaktiven Form erhalten lässt. Die Fasereigenschaften, wie der Faserdurchmesser und die Benetzbarkeit sollen zusammen mit nicht-RGD-veränderten Poly(L-lactid)-Fasern untersucht werden.

### **3.1.2.1 Systemwahl**

In den folgenden beiden Abschnitten sollen die Komponenten der synthetischen Fasermatrix dargestellt werden. Es handelt sich um das Polymer Poly(L-lactid) und um die linearen und zyklischen RGD-Peptide. Es soll speziell auf die Eigenschaften des Poly(L-lactid) und der unterschiedlichen RGD-Peptide eingegangen werden.

#### **3.1.2.1.1 Poly(L-lactid)matrixsystem**

In der Arbeit von R. DERSCH<sup>[8]</sup> wurde aus einer großen Anzahl von Polymeren, die im Körper vollständig abgebaut werden können, das Polymer Poly(L-lactid) ausgewählt. Auch in dieser Arbeit soll das Poly(L-lactid) weiterhin eingesetzt werden. Das PLLA gehört zu der Gruppe der Poly( $\alpha$ -hydroxysäuren) und wird in der Medizin sehr häufig eingesetzt. Materialien aus Poly( $\alpha$ -hydroxysäuren) werden z.B. zum medizinischen Nahtgarn verarbeitet und sind hinsichtlich ihrer Abbaueigenschaften im Körper gut untersucht. Der Abbau erfolgt durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen, was zunächst zu einer Kettenverkürzung des Polymers führt. Erst bei Unterschreiten eines bestimmten Molekulargewichts von ungefähr 5000 Dalton findet auch eine zellvermittelte Auflösung statt. Durch das Abbauprodukt Milchsäure wird jedoch der pH-Wert im benachbarten Gewebe stark gesenkt. Dadurch können inflammatorische Zellreaktionen ausgelöst werden, weil die Toxizität dramatisch ansteigt. Ein breiter Einsatz findet allerdings trotzdem statt. Poly(L-lactid) besitzt aufgrund seiner relativ hydrophoben Eigenschaften nur eine geringe Resorbierbarkeit. Auf weiterführende Angaben zum Poly(L-lactid) sei hier auf die Dissertation von R. DERSCH verwiesen.

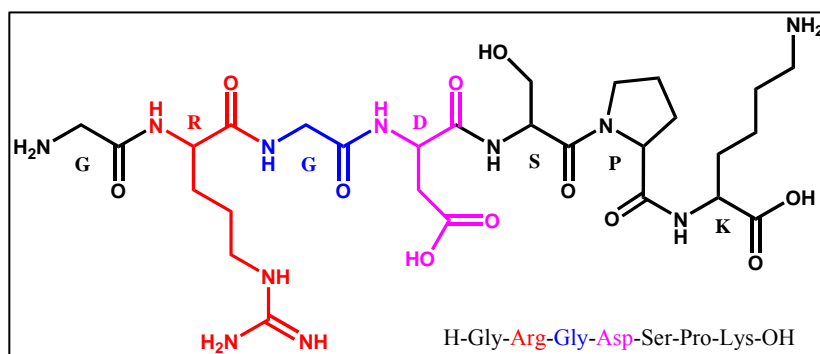
### 3.1.2.1.2 Lineare und zyklische RGD Peptide

Die Oberfläche von Poly(L-lactid)fasern soll mit linearen und zyklischen RGD-Peptiden funktionalisiert werden (Abbildungen 3.1 und 3.2). Im Abschnitt 2.2.2.2 wurde erklärt, dass die RGD-Sequenz z.B. in den Proteinen Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagen und Fibrinogen vorhanden ist.

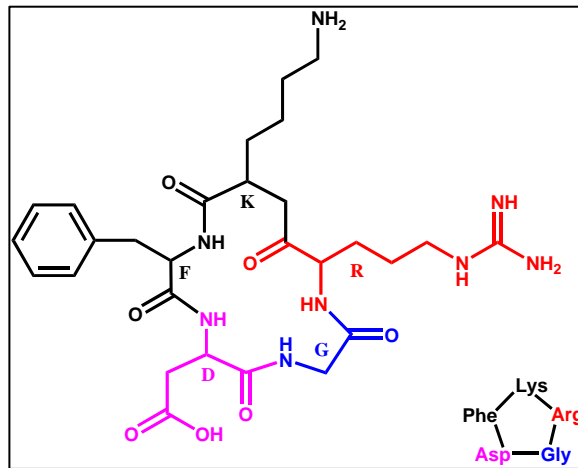
Die Verwendung von RGD-Peptiden als Zelladhäsionsmoleküle bringt mehrere Vorteile mit sich. So können gezielt ausgesuchte RGD-Peptide als Integrin-Antagonisten für jeden Zelltyp die Zell-Matrix-Wechselwirkung optimieren. Da lineare RGD-Peptide nur eine relativ geringe Affinität zu Integrinen zeigen, ist es notwendig sie zu modifizieren<sup>[193]</sup>. Eine Möglichkeit zur Modifizierung von Peptiden ist die Cyclisierung. Die daraus resultierenden Ringsysteme präsentieren die RGD-Sequenz in spezifischen Konformationen, wodurch die Aktivität und die Spezifität der RGD-Peptide erhöht werden. Das Ziel soll es sein ein RGD-Peptid in einer für die mesenchymalen Stammzellen (Integrin-Rezeptoren) bioaktiven Form zu erhalten. Die Wahl des RGD-Peptids stellt dabei den entscheidenden Schritt dar. Es muss sich um einen selektiven Antagonisten handeln mit seiner bioaktiven Konformation für die hMSC.

Einen Ansatz zur Ermittlung der bioaktiven Konformation der RGD-Sequenz im rezeptorgebundenen Zustand stellt das von KESSLER et al<sup>[194]</sup> entwickelte *Spatial Screening* dar. Dabei werden Bibliotheken stereoisomerer cyclischer Peptide synthetisiert, die eine Eingrenzung der für einen Integrinrezeptortypen optimalen Struktur ermöglichen. Die Korrelation der biologischen Aktivität mit der Peptidkonformation liefert wichtige Informationen über die aktiven Peptide und erlaubt Rückschlüsse auf den Integrinrezeptor.

Für diese Arbeit wurden kommerziell erhältliche RGD-Peptide verwendet. Es ist zu prüfen, ob sie für die mesenchymalen Stammzellen in einer bioaktiven Form vorliegen.



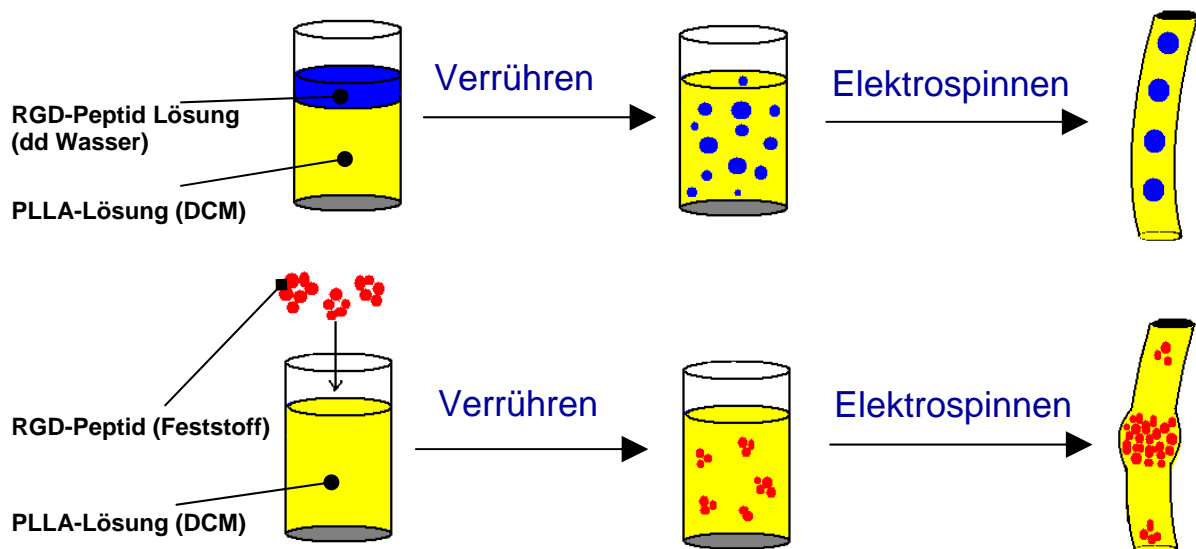
**Abbildung 3.1:** Das in dieser Arbeit verwendete lineare RGD-Peptid aus 7 Aminosäuren



**Abbildung 3.2:** Das in dieser Arbeit verwendete zyklische RGD-Peptid aus 5 Aminosäuren

### 3.1.2.2 Anreicherung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche

Eine Funktionalisierung der Faseroberfläche kann, ohne das Poly(L-lactid) selbst an der Oberfläche zu verändern, erreicht werden. In den folgenden beiden Ansätzen (Abbildung 3.3) werden Fasern aus einer PLLA/RGD-Peptid-Suspension und PLLA/RGD-Peptid-Emulsion hergestellt. Das RGD-Peptid soll dabei in seiner bioaktiven Form angereichert werden.

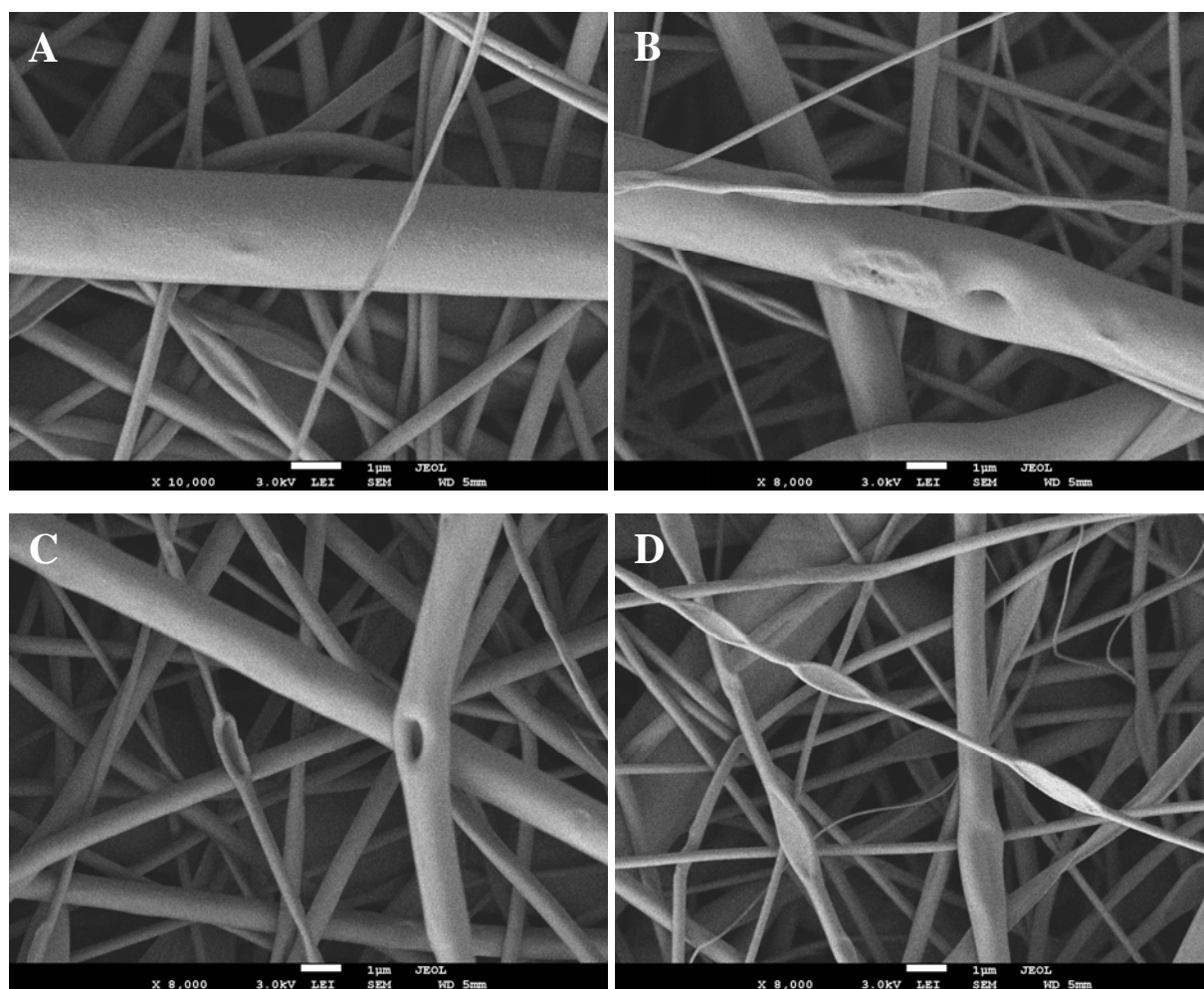


**Abbildung 3.3:** Herstellung der PLLA-RGD-Suspension und PLLA-RGD-Emulsion

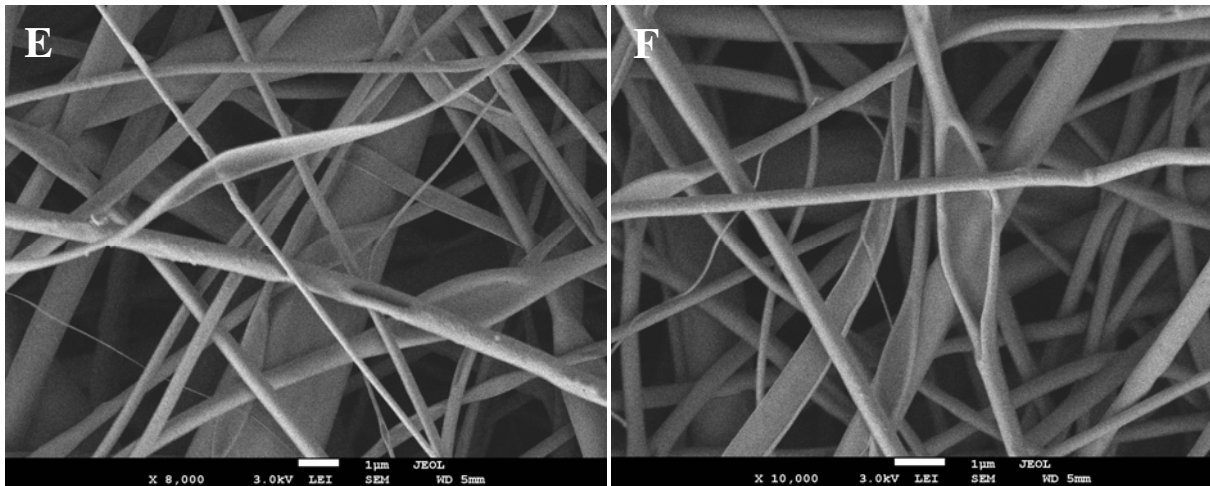
#### 3.1.2.2.1 Untersuchungen zu Fasern aus PLLA/RGD-Emulsion

Die Herstellung von PLLA/RGD-Emulsionen wird im experimentellen Teil beschrieben. Für die Faserherstellung wird die PLLA-RGD-Emulsion in eine 1 ml Spritze aufgenommen und bei einem elektrischen Feld von 20 kV durch eine Kanüle (0,45 mm Durchmesser) gedrückt. Der Abstand zwischen der Kanüle und der Gegenelektrode liegt bei 15 cm. Die Flussrate wird bei 0,12 ml pro Stunde gehalten. Die PLLA-Fasern werden auf sterilen Glasplättchen hergestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit wird unter 15 % gehalten. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird auf Siliziumträger gesponnen. Bei Verspinnen der PLLA-RGD-Emulsion reduziert sich der mittlere Faserdurchmesser von  $1020 \pm 690$  nm auf  $790 \pm 730$  nm.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen die einzelnen Zwischenstufen der Bandentstehung bei den Fasern beim Verspinnen einer PLLA/RGD-Emulsionen (Abbildungen 3.4 A bis F).

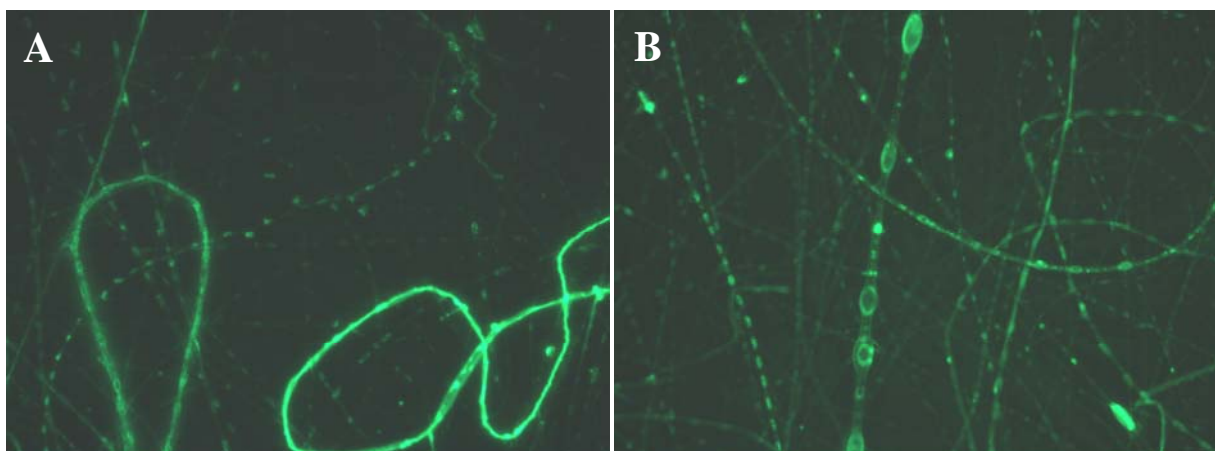


**Abbildungen 3.4:** A - D) Faserbandstrukturen beim Verspinnen einer PLLA-RGD-Emulsion



**Abbildungen 3.4:** E - F) Faserbandstrukturen beim Verspinnen einer PLLA-RGD-Emulsion

Zu den Verteilungsuntersuchungen der RGD-Sequenzen in den PLLA-Fasern wurde das lineare Fluoresceinisocyanat(FITC)-RGD verwendet und jeweils eine Suspension und Emulsion hergestellt.

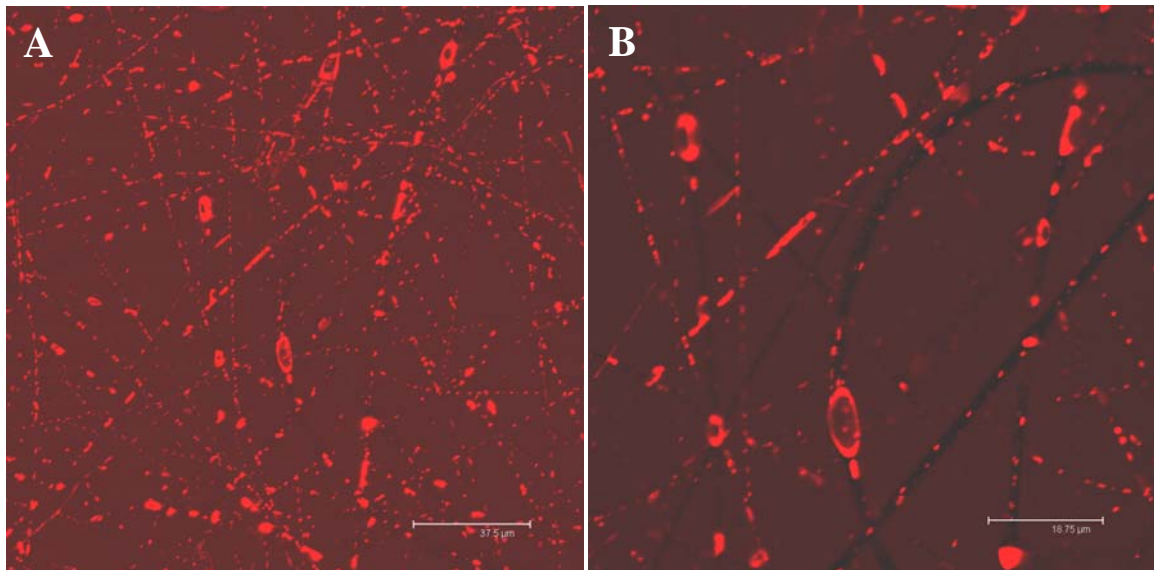


**Abbildungen 3.5:** A-B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PLLA/FITC-RGD Emulsionsfasern

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildungen 3.5 A-B) der PLLA/FITC-RGD Emulsionsfasern wird eine homogene Faserfluoreszenz beobachtet. In den einzelnen Beads scheint sich mehr FITC-RGD zu konzentrieren.



Zur besseren Untersuchungen der FITC-RGD-Peptid-Verteilung wurden PLLA/FITC-RGD Emulsionsfasern auch mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

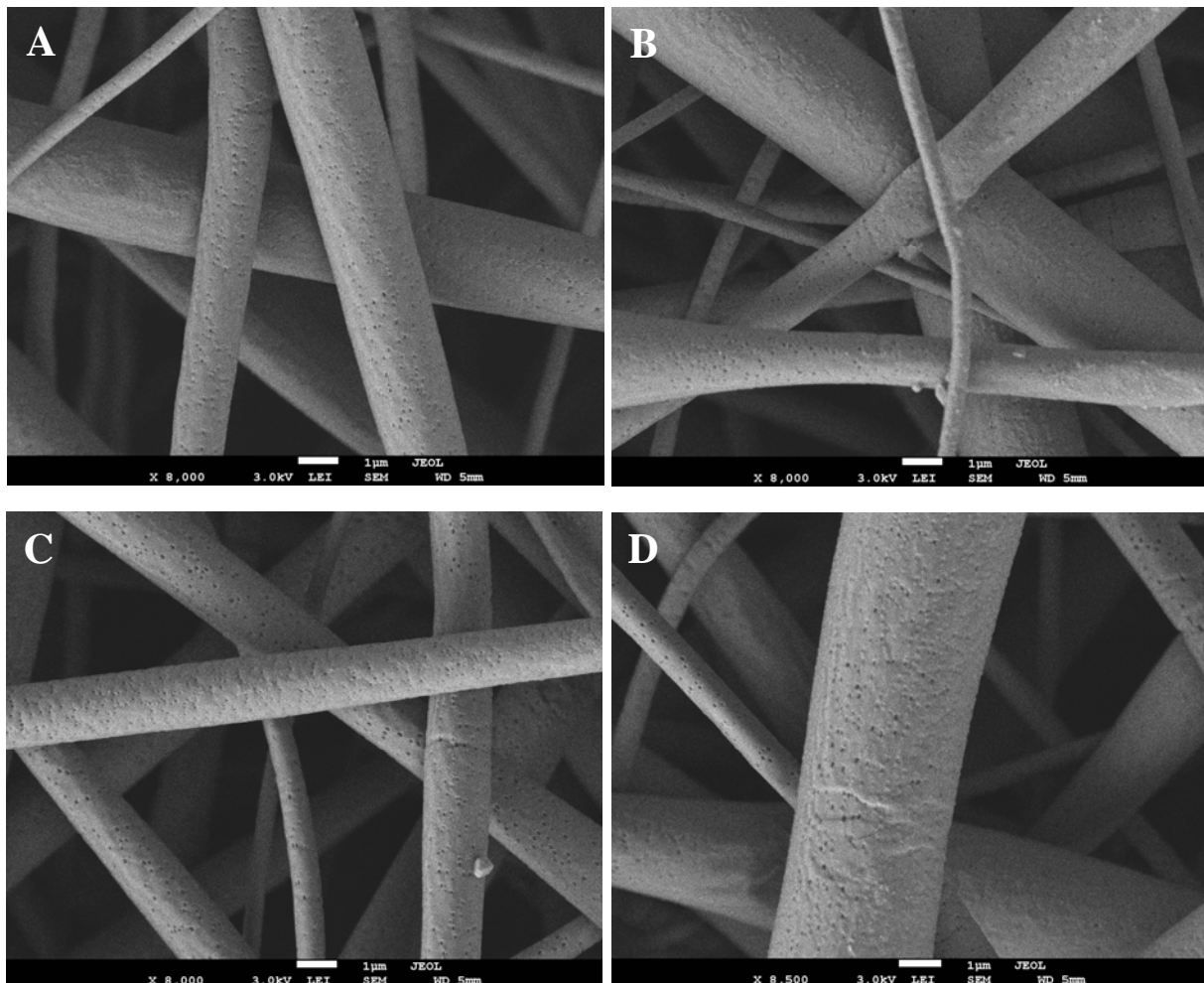


**Abbildungen 3.6:** A-B) Konfokal fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PLLA/FITC-RGD Emulsionsfasern mit inhomogener Verteilung

Die konfokal fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abbildungen 3.6 A-B) zeigen Bereiche mit viel und wenig FITC-RGD innerhalb einer Faser. In sogenannten Beads scheint eine höhere FITC-RGD-Konzentration vorzuliegen. Die Verteilung des FITC-RGD erscheint im Vergleich zu fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen viel inhomogener.

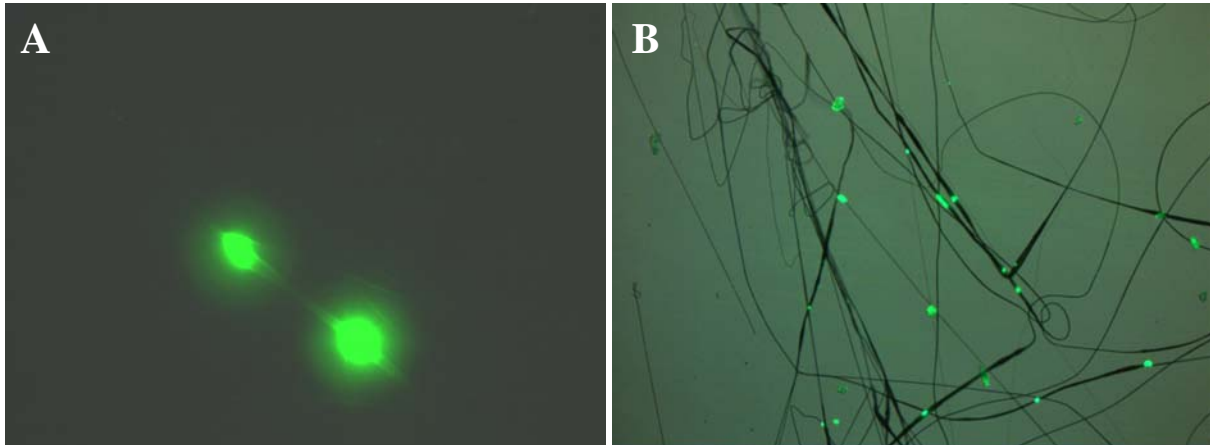
### 3.1.2.2.2 Untersuchungen zu Fasern aus PLLA/RGD-Suspension

Die Herstellung von PLLA/RGD-Suspensionen wird im experimentellen Teil beschrieben. Für die Faserherstellung wird die PLLA-RGD-Suspension in eine 1 ml Spritze aufgenommen und bei einem elektrischen Feld von 20 kV durch eine Kanüle (0,45 mm Durchmesser) gedrückt. Der Abstand zwischen der Kanüle und der Gegenelektrode liegt bei 15 cm. Die Flussrate wird bei 0,12 ml pro Stunde gehalten. Die PLLA-Fasern werden auf sterilen Glasplättchen hergestellt, die relative Luftfeuchtigkeit wird unter 15 % gehalten. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird auf Siliziumträger gesponnen. Bei Verspinnen der PLLA-RGD-Suspension reduziert sich der mittlere Faserdurchmesser von  $1020 \pm 690$  nm auf  $880 \pm 450$  nm. Es werden keine Bandstrukturen beobachtet, dagegen eine leicht poröse Struktur (Abbildungen 3.7 A-D).



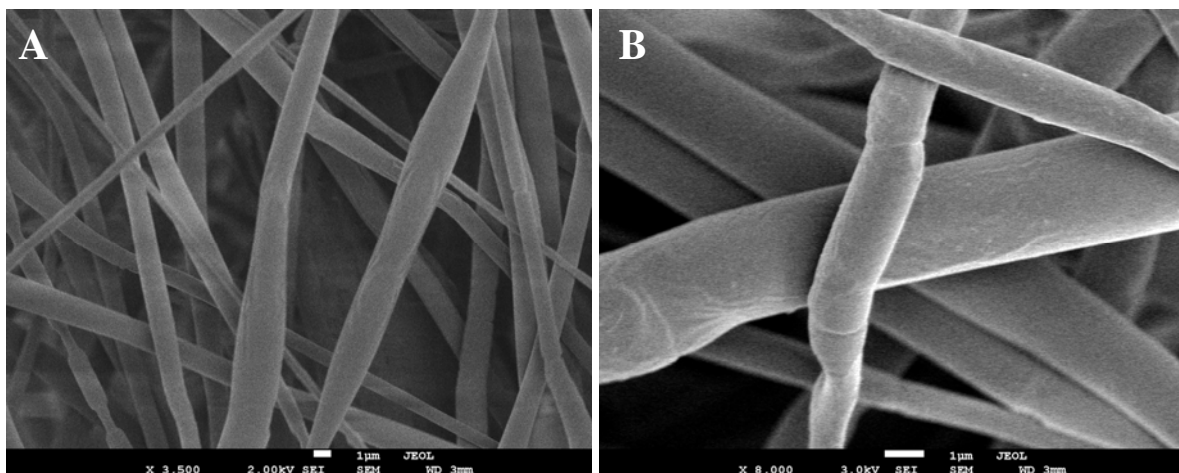
**Abbildungen 3.7:** A-D) Leicht poröse Fasern aus einer PLLA-RGD-Suspension;

Zu den Verteilungsuntersuchungen der RGD-Sequenzen in den PLLA-Fasern wurde wie schon erwähnt das lineare Fluoresceinisocyanat(FITC)-RGD verwendet. Es wurde eine entsprechende Suspension hergestellt und diese durch das Elektrosplennen zu Fasern verarbeitet.



**Abbildungen 3.8:** A-B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der PLLA/FITC-RGD Suspensionsfasern

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildungen 3.8 A-B) der PLLA/FITC-RGD Suspensionsfasern werden FITC-RGD-Peptid-Agglomerate beobachtet.

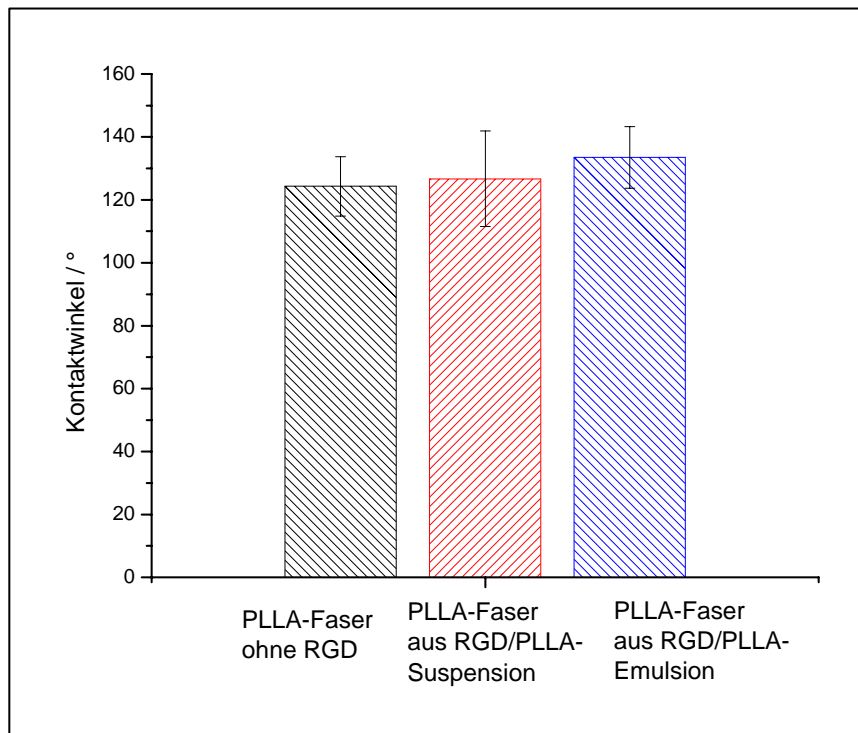


**Abbildungen 3.9:** A-B) Glatte PLLA-Fasern ohne RGD-Peptid

Zum besseren Vergleich wurden auch glatte PLLA-Fasern ohne RGD-Peptid hergestellt. Entsprechende elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abbildungen 3.9 A-B) zeigen eine glatte PLLA-Oberfläche. Der mittlere Faserdurchmesser beträgt  $1020 \pm 690$  nm.

Von allen drei Fasertypen wurde der statische Kontaktwinkel für Wasser bestimmt:

PLLA-Fasern glatt ohne RGD:	$124,3^\circ \pm 9,4^\circ$ (20 Messungen)
PLLA-Fasern aus PLLA-RGD-Emulsion	$133,5^\circ \pm 9,8^\circ$ (20 Messungen)
PLLA-Fasern aus PLLA-RGD-Suspension	$126,7^\circ \pm 15,2^\circ$ (20 Messungen)

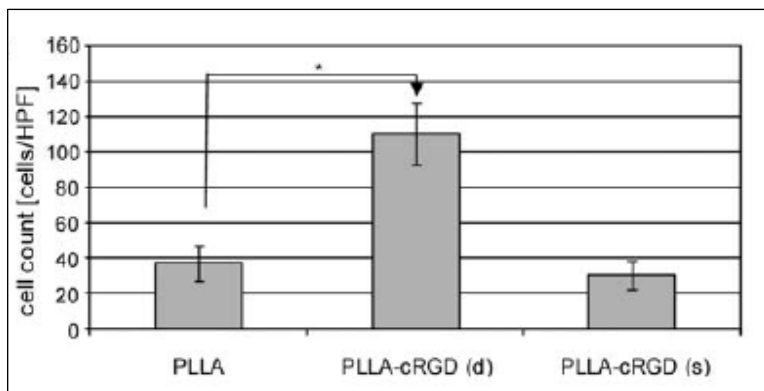


**Abbildung 3.10:** Kontaktwinkel auf PLLA-Fasern ohne RGD, auf PLLA-Fasern aus einer RGD/PLLA-Suspension und einer RGD/PLLA-Emulsion

Wie die Abbildung 3.10 zeigt, führt die Anreicherung des RGD-Peptids nicht zu einer Verbesserung der Oberflächenhydrophilie. Deswegen kann eine eventuelle verbesserte Zellantwort nicht auf eine bessere Benetzbarkeit der Fasermatrices zurückgeführt werden.

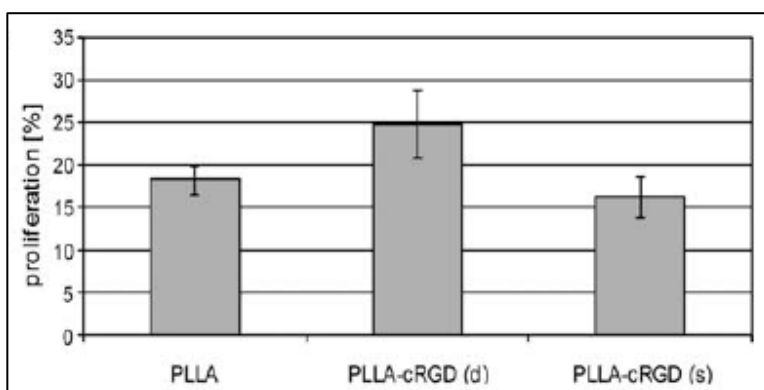
### 3.1.2.3 Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices mit angereicherten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche

Zur Bestimmung der biologischen Antwort, wie die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Proliferation, wurden humane mesenchymale Stammzellen von unserem Kooperationspartner von der Orthopädie Marburg auf den unterschiedlichen Fasermatrices ausgesät. Dazu wurden Zellen mit einer Dichte von ungefähr 12.500 Zellen pro besponnenem Deckglas gebracht. Nach einer Adhäsionszeit von vier Stunden wird die Zellanzahl bestimmt. In Abbildung 3.11 ist zu sehen, dass signifikant mehr Zellen auf den Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD-Emulsion adherieren. Fasern ohne RGD und aus der PLLA/cycRGD Suspension zeigen eine deutliche geringere Zellanzahl.



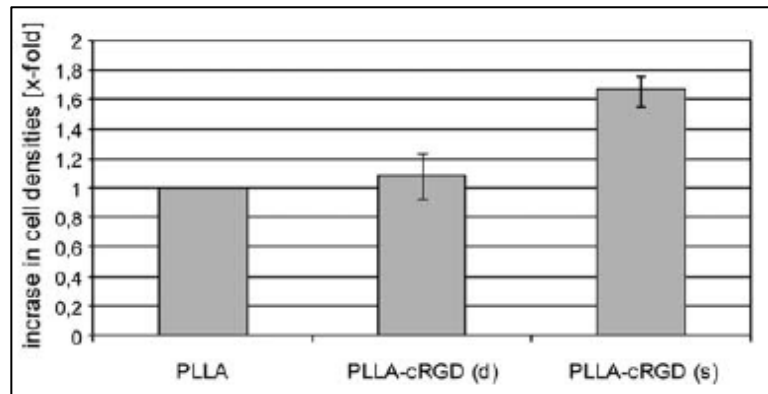
**Abbildung 3.11:** Zelladhäsion auf PLLA-Fasern, Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s))

Auch die Proliferationsrate der hMSC auf den Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD-Emulsion steigt leicht an, wie in der Abbildung 3.12 zu sehen ist.



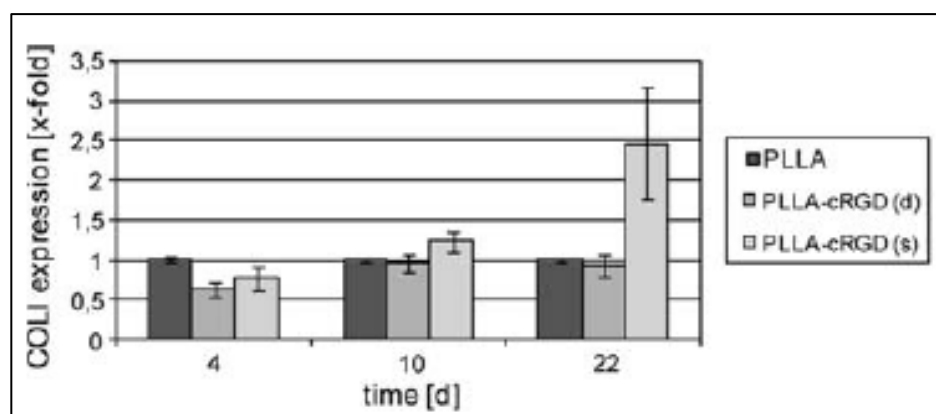
**Abbildung 3.12:** Proliferationsrate auf PLLA-Fasern, Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s))

Es wurde ein große Variation der Ergebnisse auf den einzelnen Fasermatrices beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von 22 Tagen kann eine größere Zelldichte auf Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension festgestellt werden (Abbildung 3.13).

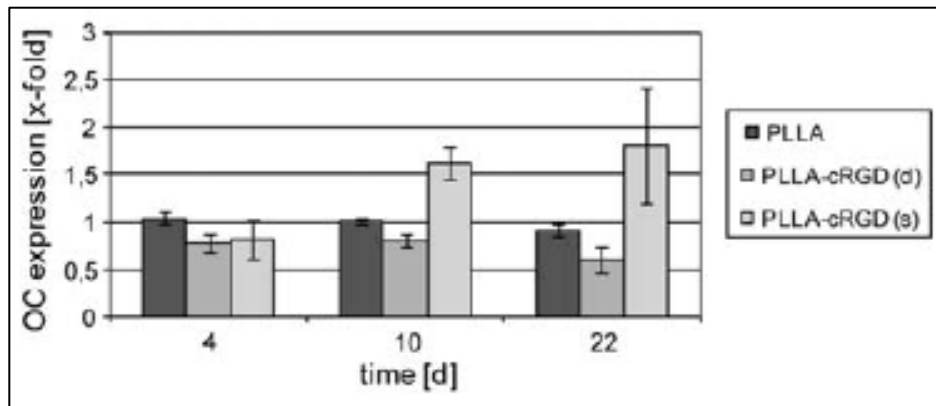


**Abbildung 3.13:** Größere relative Zelldichte auf Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s)) im Vergleich zu PLLA-Fasern und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und

Der Unterschied in der Bildung der extrazellulären Matrix der Zellen auf den verschiedenen Fasertypen wurde durch den Vergleich der Genexpression bestimmt. Dazu wurde jeweils die Menge des beim Zellwachstum gebildeten Kollagens (Typ I) und Osteokalzins untersucht. In der Abbildungen 3.14 und 3.15 ist zu sehen, dass die Genexpression der Matrixproteine Kollagen (Typ I) und Osteokalzin auf den Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD-Suspension deutlich höher ist. Dagegen ist die Genexpression auf den Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD-Emulsion auf dem gleichen Niveau wie Fasern ohne zyklischRGD.

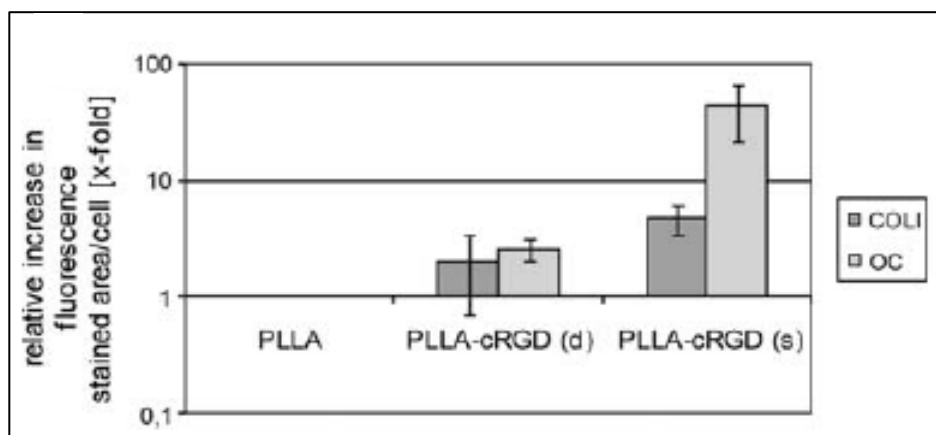


**Abbildung 3.14:** Kollagen (Typ I)-Expression auf PLLA-Fasern, Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s)) nach 4, 10 und 22 Tagen



**Abbildung 3.15:** Osteokalzin-Expression auf PLLA-Fasern, Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s)) nach 4, 10 und 22 Tagen

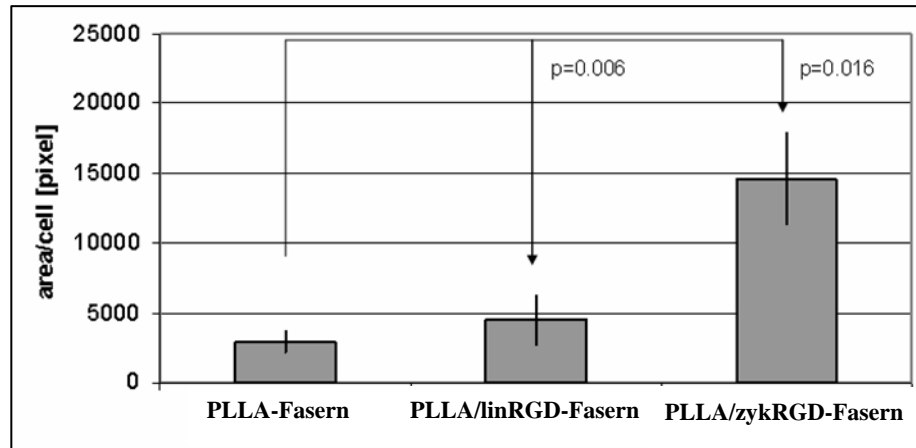
In Abbildung 3.16 ist die relative Zunahme der Fluoreszenz des abgeschiedenen Kollagens (Typ I) und des Osteokalzin auf den unterschiedlichen Fasertypen nach 22 Tagen Inkubationszeit zu sehen.



**Abbildung 3.16:** Relative Fluoreszenzzunahme von Kollagen (Typ I) und Osteokalzin auf PLLA-Fasern, Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Emulsion (PLLA-cRGD (d)) und Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (PLLA-cRGD (s)) nach 22 Tagen

Eine starke Zunahme des abgeschiedenen Kollagens (Typ I) und noch viel stärker des abgeschiedenen Osteokalzins ist auf den Fasern aus einer PLLA/zyklischRGD Suspension (s) zu beobachten.

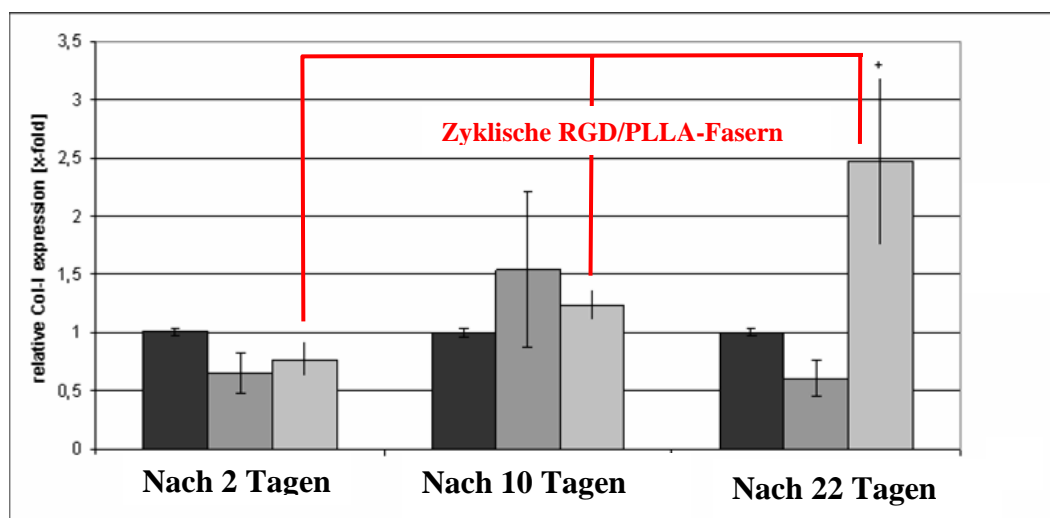
Zur Bestimmung des Einflusses der RGD-Konformation auf die Adhäsion und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen wurden lineare und zyklische RGD-Peptide in Form einer Suspension zu Fasern verarbeitet.



**Abbildung 3.17:** Anzahl der hMSC pro Fläche auf PLLA-, PLLA/linearRGD- und PLLA/zyklischRGD-Fasern

Die RGD-Konformation des linearen Peptids liegt nicht in einer für die Integrin-Rezeptoren bioaktiven Form vor. In der Abbildung 3.17 ist der Effekt auf die Zelladhäsion des zyklischen RGD-Peptids im Vergleich zu PLLA-Fasern mit und ohne lineares RGD deutlich zu erkennen.

In der Abbildung 3.18 wurde die relative Kollagen (Typ I)-Expression auf Fasern ohne RGD (schwarzer Balken), auf Fasern aus einer PLLA/linearRGD-Suspension und PLLA/zyklischRGD-Suspension bestimmt.

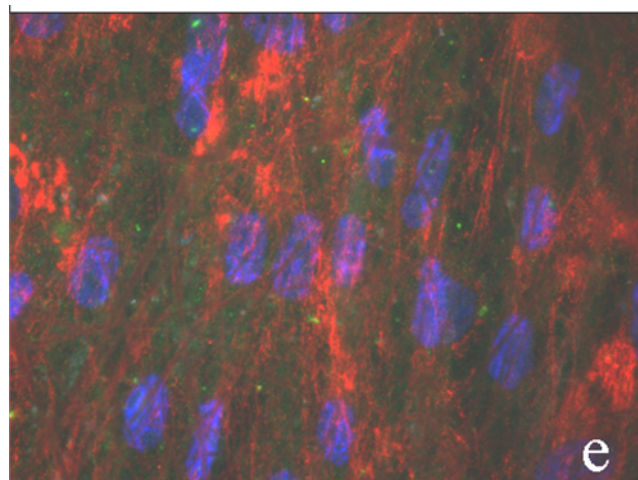


**Abbildung 3.18:** Relative Kollagen (Typ I)-Expression auf Fasern ohne RGD (schwarzer Balken), auf Fasern aus einer PLLA/linearRGD-Suspension und PLLA/zyklischRGD-Suspension nach 2, 10 und 22 Tagen



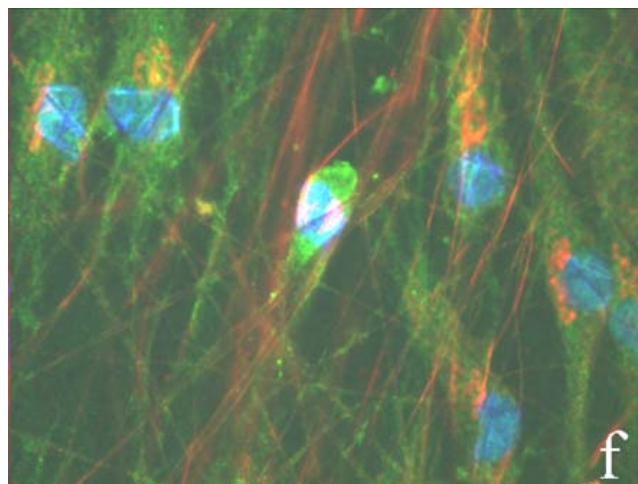
Nach zwei Tagen Inkubationszeit gibt es keinen signifikanten Unterschied der Kollagen (Typ I)-Expression auf den verschiedenen Fasertypen. Nach 10 Tagen steigt die Kollagen (Typ I)-Expression auf den Fasern mit einer linearen RGD-Sequenz leicht an. Nach 22 Tagen ist dagegen eine signifikante Zunahme der Kollagen (Typ I)-Expression auf PLLA/zyklischRGD-Fasern zu beobachten.

Im Folgenden werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Kollagen (rot) und Osteokalzin (grün) gezeigt. Wie in der Abbildung 3.19 zu sehen, exprimieren die mesenchymalen Stammzellen das rot fluoreszierende Kollagen auf PLLA-Fasern ohne RGD-Peptiden.



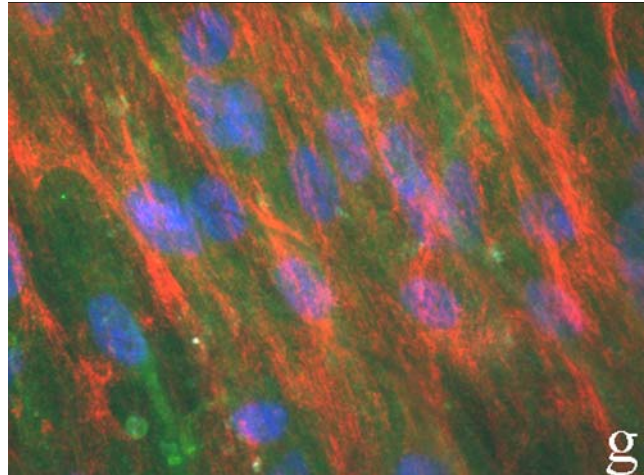
**Abbildung 3.19:** Fluoreszenzaufnahmen von Mesenchymalen Stammzellen auf PLLA-Fasern ohne RGD  
(blau: Zellkern; rot: exprimiertes Kollagen; grün: exprimiertes Osteokalzin)

Weniger Kollagen, dagegen mehr Osteokalzin wird von den hMSC auf den PLLA-Fasern mit linearen RGD-Peptiden exprimiert (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** Fluoreszenzaufnahmen von Mesenchymalen Stammzellen auf PLLA/linearRGD-Fasern  
(blau: Zellkern; rot: exprimiertes Kollagen; grün: exprimiertes Osteokalzin)

In der Abbildung 3.21 ist ein erhöhter Kollagenanteil von hMSC auf den PLLA-Fasern mit zyklischem RGD exprimiert worden.



**Abbildung 3.21:** Fluoreszenzaufnahmen von Mesenchymalen Stammzellen auf PLLA/zyklischRGD-Fasern (blau: Zellkern; rot: exprimiertes Kollagen; grün: exprimiertes Osteokalzin)

Das Einbringen von zyklischen RGD-Peptiden in Form einer Suspension hat in dieser Reihe den höchsten biologischen Effekt auf die mesenchymalen Stammzellen. So konnte eine Funktionalisierung der Faseroberfläche erreicht werden ohne das Poly(L-lactid) selbst an der Oberfläche zu verändern. Die beiden Ansätze, wo einmal Fasern aus einer PLLA/RGD-Peptid-Suspension und PLLA/RGD-Peptid-Emulsion hergestellt werden, reichern das RGD-Peptid in seiner bioaktiven Form an. Das zeigt die Wechselwirkung der Faserobefläche mit dem Integrinrezeptor  $\alpha v \beta 3$  deutlich an.

Verglichen mit früheren Untersuchungen der PLLA-Fasern zeigt die Faseroberfläche keine Poren<sup>[195]</sup>. Die Ursache liegt darin, dass während des Spinnprozesses die Luftfeuchtigkeit gering gehalten wird. So können sich keine Wassertropfchen als Template an der Polymeroberfläche anlagern und Poren hinterlassen. Außerdem wird ein geringerer Faserdurchmesser erhalten. Begründet werden kann dies durch die erhöhte Leitfähigkeit durch das Einbringen von RGD-Peptiden in die Lösung. Das Einbringen von RGD-Peptiden als Emulsion und Suspension und die daraus hergestellten Fasern verursacht keine Veränderung in der Benetzbarkeit. Deswegen kann eine erhöhte Adhäsion von hMSC nicht auf die verbesserten Benetzungseigenschaften zurückgeführt werden. Auch die Fasermorphologie spielt keine Rolle, denn bei jedem Fasertyp wurde eine glatte Oberfläche erhalten.

Eine viel größere Rolle spielt die Verfügbarkeit der RGD-Peptiden an der Faseroberfläche. Diese kann über eine bessere Verteilung der RGD-Peptide in der Faser erreicht werden. Eine Verbesserung der Zelladhäsion zeigt eine verbesserte RGD-Integrin-Wechselwirkung an. Eine verbesserte Interaktion wurde bei Fasern, die aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Emulsion hergestellt wurden erreicht, da hier eine bessere Verteilung der RGD-Peptiden realisiert wurde. Die Verbesserung der Adhäsion von hMSC hat jedoch keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung der hMSC. Eine verbesserte Bildung der extrazellulären Matrix im Vergleich zu Fasern ohne RGD wird nicht erreicht, das zeigen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und die Genexpressionsanalyse. Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Emulsion vermitteln nämlich nicht das osteogene Potential von Kollagen. Ganz anders zeigen sich Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Suspension. Diese vermitteln einigermaßen das osteogene Potential von Kollagen, das zeigen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und die Genexpressionsanalyse.

Der Anstieg der Genexpression auf den Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Suspension war jedoch deutlich niedriger als im gleichen Zeitraum auf Kollagenfasern<sup>[195]</sup>. Die Gründe dafür könnten sein, dass die RGD-Sequenzen in Kollagen in einer besseren Verfügbarkeit und in der bioaktiven Konformation für die Integrinrezeptoren der hMSC vorliegen.

### **3.1.3 Entwicklung einer RGD beschichteten Poly(L-lactid)matrix für die *in vitro* Zellkultivierung**

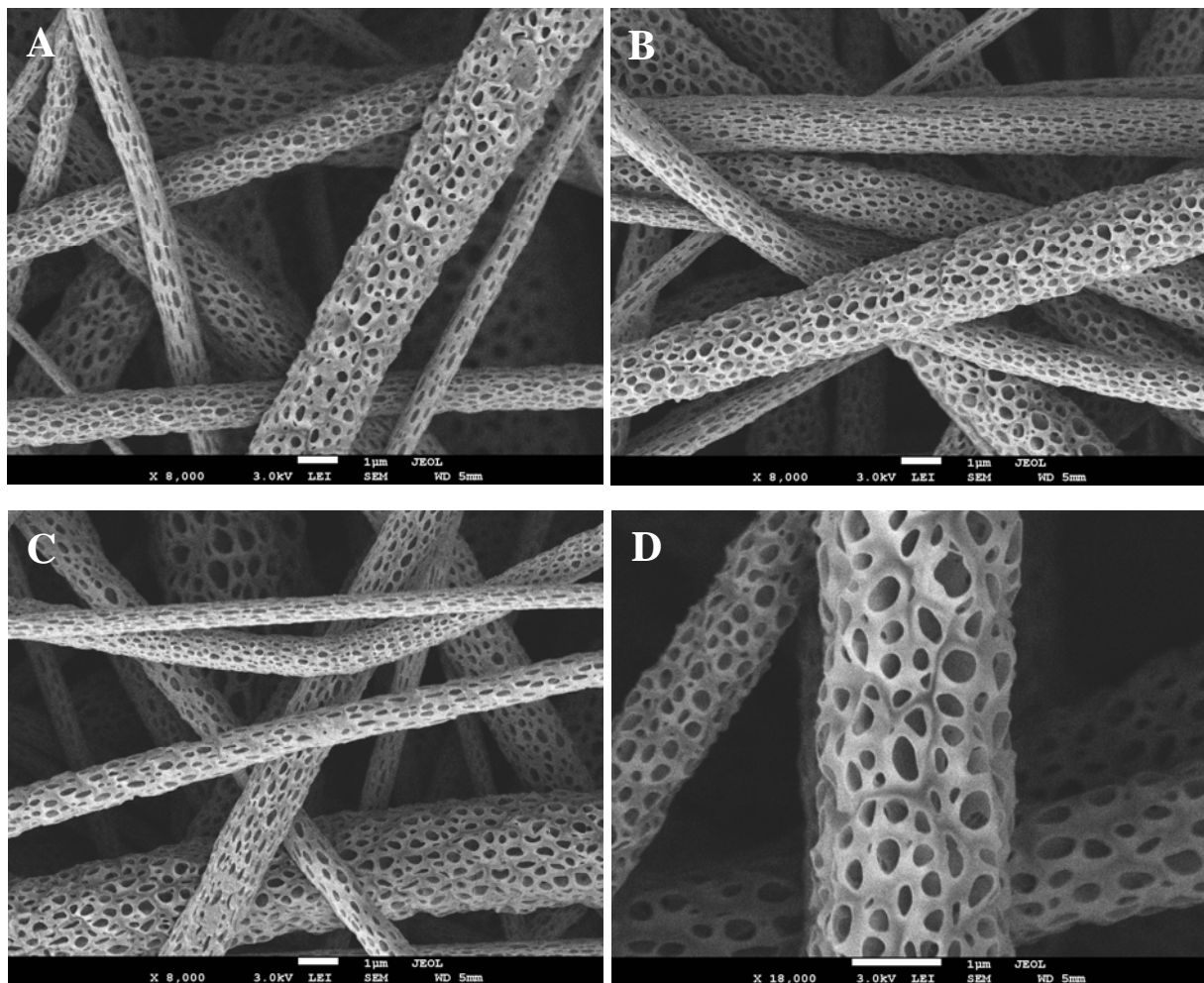
Durch die Entwicklung einer synthetischen Poly(L-lactid)fasermatrix mit funktionalisierter Oberfläche durch das Anbinden von bioaktiven RGD-Peptiden wird eine deutliche Verbesserung der Adhäsion, des Wachstums und der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) angestrebt. Durch die direkte Anbindung der Wirksubstanz in Form eines zyklischen RGD-Peptids an die Faseroberfläche soll die Wechselwirkung zwischen der synthetischen Matrix und der Integrinrezeptoren der Zellen verstärkt werden. Dabei soll geprüft werden, ob die poröse Struktur der PLLA-Fasern beim Anbinden der RGD-Peptide erhalten werden kann. Die große Oberfläche und die poröse Struktur von PLLA-Fasern sollte den Kontakt zwischen den RGD-Peptiden und den dazugehörigen Integrin-Rezeptoren der Zellen weiter verbessern. Auf diesen RGD-funktionalisierten Fasermatrizes sollen hMSC ausgesät und über eine Zeitdauer von 22 Tagen unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen kultiviert und analysiert werden.

Um die Anbindung der zyklischen RGD-Peptide an die Faseroberfläche zu realisieren soll zunächst die Faseroberfläche mit Sauerstoffplasma aktiviert werden. Dabei sollen sich funktionelle Gruppen in Form von Carboxylgruppen bilden. Dadurch können verbesserte Oberflächeneigenschaften der Faser, wie die Reduzierung der Hydrophobie der PLLA-Oberfläche, erreicht werden. Die neu gebildeten Carboxylgruppen sollen weiterhin als „Anker“ für das Anbinden der zyklischen RGD-Peptide genutzt werden. Es sollen Kopplungsreagenzien, wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) zum Einsatz kommen, um eine kovalente Bindung zwischen der Faseroberfläche und den RGD-Peptiden zu realisieren.

Da Sauerstoffplasma nur die ersten 10 Nanometer einer Polymeroberfläche verändert, sollen die guten mechanischen Eigenschaften von PLLA-Fasern, wie das Elastizitätsmodul und die maximale Reißfestigkeit erhalten bleiben.

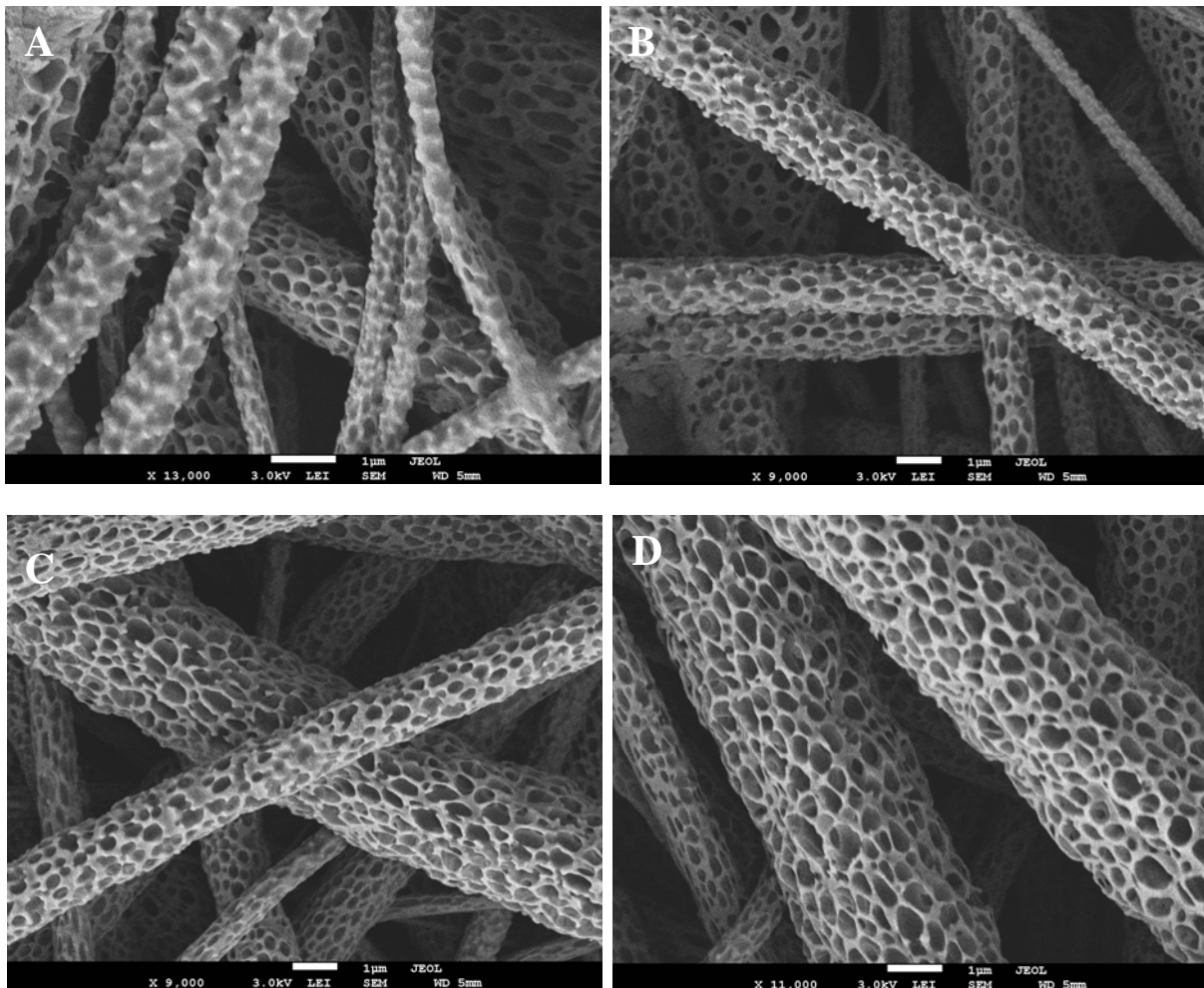
### 3.1.3.1 Einfluss des Sauerstoffplasmas auf die Poly(L-lactid)oberfläche und die mechanischen Eigenschaften

Für die Untersuchungen des Einflusses von Sauerstoffplasma auf die Polymeroberfläche von Poly(L-lactid)fasern wurden zunächst poröse Fasern hergestellt. Dazu wurde eine 4 wt % PLLA-Lösung elektroversponnen. Die Spinnparameter wurden wie in den Versuchen zuvor beibehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde als einziger Parameter verändert und auf 42 % erhöht. Es wurde auf runde Glasplättchen und für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen auf Siliziumträger gesponnen. Anschließend wurden einige Proben eine Minute mit Sauerstoffplasma behandelt. Die Oberfläche der beiden Faserproben wurde im SEM untersucht. Der mittlere Faserdurchmesser lag bei den unbehandelten Fasern bei  $1,3 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$  und es wurde eine stark poröse Morphologie beobachtet (Abbildungen 3.22 A-D).



Abbildungen 3.22: A-D) Poröse PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung

Bei den plasmabehandelten porösen PLLA- Fasern ergaben die SEM-Untersuchungen, dass sich der mittlere Faserdurchmesser von  $1,3 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$  auf  $1,21 \mu\text{m} \pm 0,76 \mu\text{m}$  reduziert hat. Außerdem wurde eine Veränderung der Poly(L-lactid)oberfläche festgestellt (Abbildungen 3.23 A-D). Die Poren der Fasern mit einem Faserdurchmesser unter  $1 \mu\text{m}$  scheinen teilweise verschlossen zu sein. Dazu wird eine rauere Faseroberfläche beobachtet. Bei den Fasern mit einem Faserdurchmesser über  $1 \mu\text{m}$  wird PLLA-Material zwischen den Poren abgebaut oder geschmolzen. Die „Porenstege“ richten sich teilweise nach außen und bilden so eine raue Oberfläche.



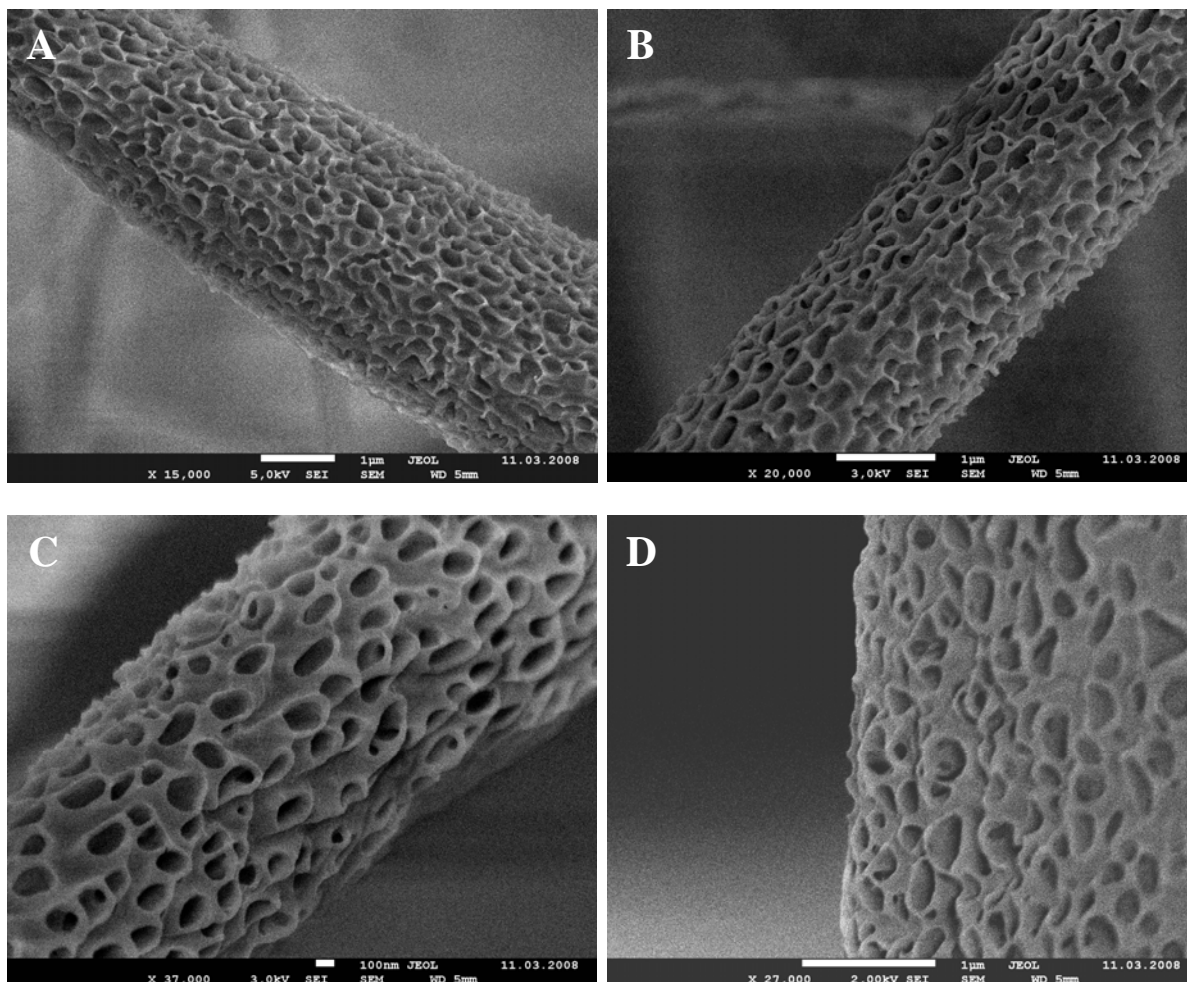
**Abbildungen 3.23:** A-D) Raue bis poröse Oberfläche der sauerstoffplasmabehandelte PLLA-Fasern

Um diese Veränderungen der Oberfläche der porösen Poly(L-lactid) zu bestätigen, wurden im zweiten Versuch poröse PLLA-Fasern unter gleichen Bedingungen hergestellt und diesmal einer Sauerstoffbehandlung von einer und drei Minuten unterzogen. Bei den



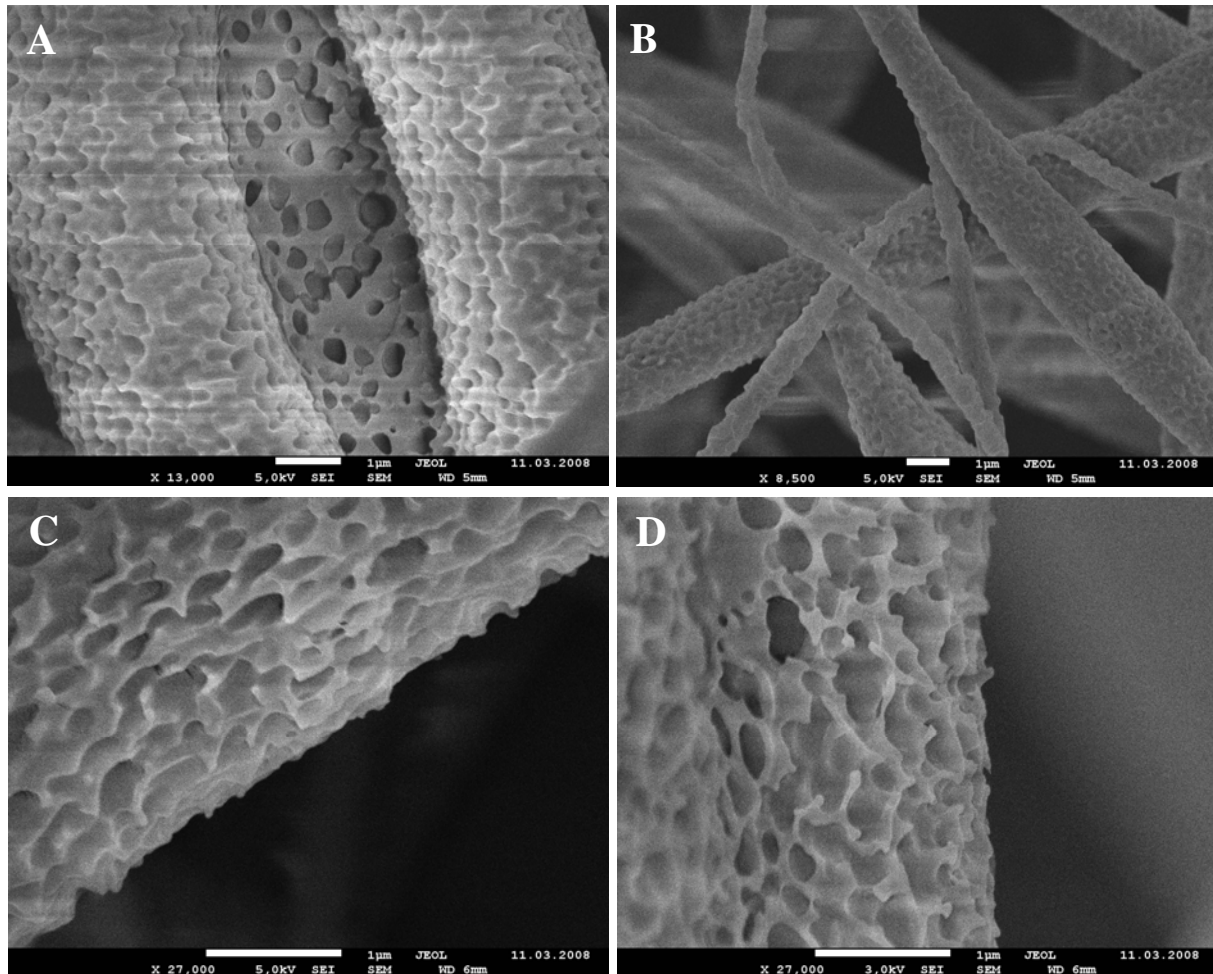
elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Fasern über 1  $\mu\text{m}$  ausgesucht, um besser die Poly(L-lactid)oberfläche untersuchen zu können.

Die Abbildungen 3.24 A-D) zeigen Fasern nach einer Minute Sauerstoffplasmabehandlung und bestätigen die bereits im ersten Versuch erhaltene raue PLLA-Oberfläche

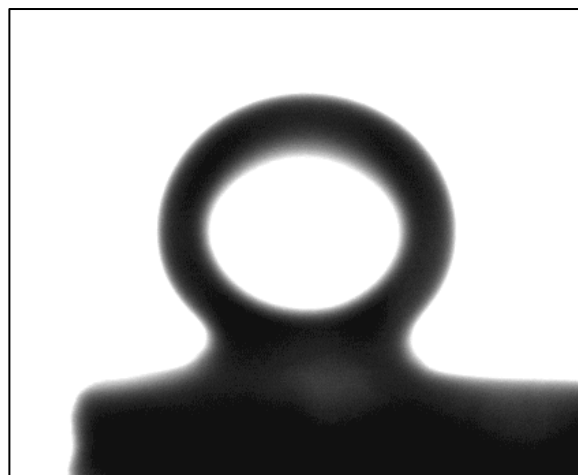


**Abbildungen 3.24:** A-D) Poröse PLLA-Fasern von Plasma angeätzt. PLLA-Material zwischen den Poren wird abgebaut und es resultiert eine rauere Faseroberfläche

Das PLLA-Material welches die Poren umgibt wird teilweise abgebaut (Abbildung 3.24 A). Auf bestimmten Fasern bleibt jedoch die Porenstruktur partiell erhalten (Abbildung 3.24 C). Zum besseren Verständnis tragen die drei Minuten plasmabehandelten Proben bei. Mit längerer Sauerstoffplasmabehandlung wird das PLLA-Material zwischen den Poren abgetragen. Es resultieren teilweise spitze Dornen und eine raue Oberflächenbeschaffenheit. (Abbildung 3.25 C). Es sollte geklärt werden, wie sich diese raue Oberfläche auf die Benetzbarkeit auswirkt. Deswegen wurde auch der Kontaktwinkel an diesen Proben gemessen. Dieser stieg im Vergleich zu den unbehandelten Proben von  $120^\circ$  auf  $150^\circ$  an.



**Abbildungen 3.25:** A-D) Poröse PLLA-Fasern 3 Minuten einer Plasmabehandlung unterzogen



**Abbildung 3.26:** Zunahme der Hydrophobie durch 1 Minute Plasmabehandlung von porösen PLLA-Fasern

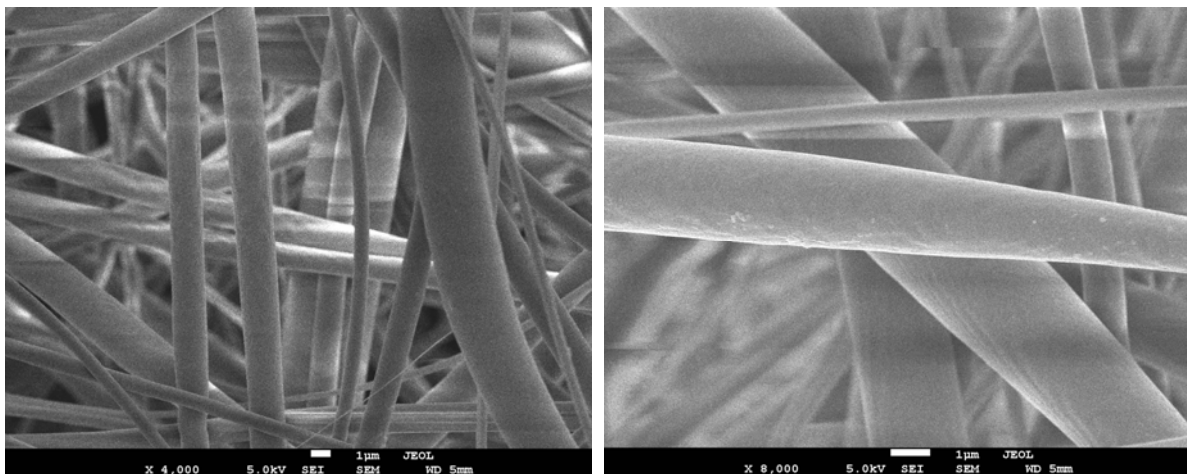
Es wurden Kontaktwinkel bis  $150^\circ$  gemessen (Abbildung 3.26). Es haben sich superhydrophobe Oberflächeneigenschaften durch die Nanostrukturierung ergeben. Die Oberflächenstruktur erinnert an die Oberflächenstruktur des Lotusblates.



### 3.1.3.1.1 Kontaktwinkelmessungen an glatten PLLA-Fasern

Die Plasmabehandlung von porösen PLLA-Fasern führt in diesem Fall zur Erhöhung der Hydrophobie. Das sollte auf die physikalische Nanostrukturierung der PLLA-Oberfläche zurückgeführt werden, die in diesem Fall ausgeprägter ist als die chemische Oberflächenmodifizierung. In vielen Anwendungen sind diese Oberflächeneigenschaften wünschenswert. Eine hohe Hydrophobie, wie beim Lotuseffekt führt zur besseren Schmutzabweisung. Im Bereich des Tissue Engineerings sind jedoch hydrophobe Oberflächeneigenschaften eher vom Nachteil für das Zellwachstum. Bei der chemischen Oberflächenmodifizierung durch die Sauerstoffplasmabehandlung von PLLA-Fasern wird ihre Oberfläche aktiviert. Dadurch steigt die Oberflächenenergie und die Benetzung nimmt in der Regel zu. Weiterhin werden funktionelle Gruppen an der Faseroberfläche in Form von Carboxylgruppen eingeführt, dadurch steigt die Hydrophilie der Oberfläche weiter an. Das sollte zur Reduzierung des Kontaktwinkels führen.

Es sollte in den weiteren Experimenten eine Erhöhung der Oberflächenhydrophilie erzielt werden, deswegen wurden keine weiteren Untersuchungen an plasmabehandelten porösen PLLA-Fasern durchgeführt. Stattdessen wurde eine glatte PLLA-Oberfläche angestrebt. Diese wurde dadurch erreicht, dass beim Elektrospinprozess die relative Luftfeuchtigkeit unter 15 % gehalten wurde.

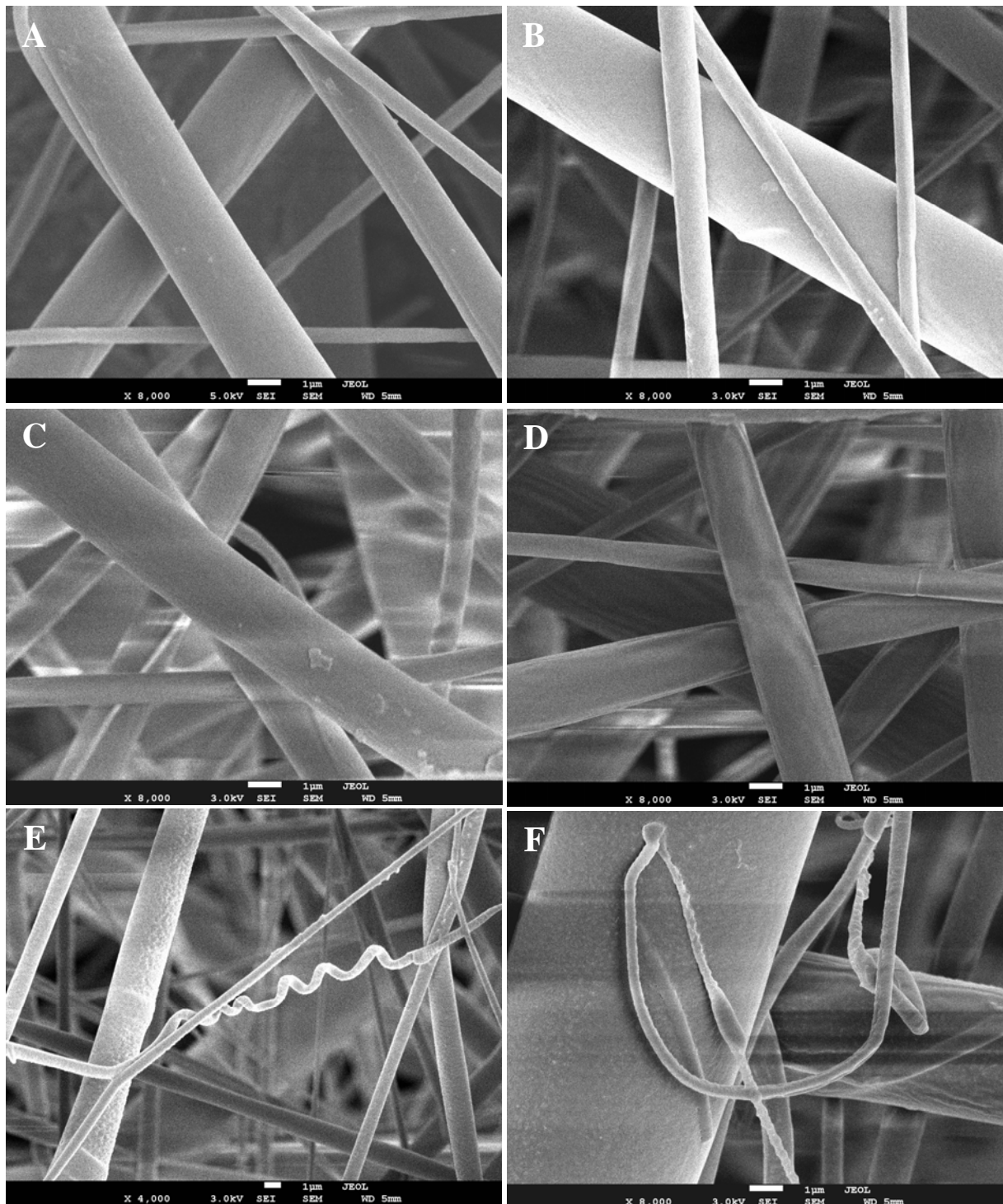


**Abbildungen 3.27:** Glatte PLLA-Fasern durch Reduzierung der relativen Luftfeuchtigkeit beim Spinnprozess

Es wurden PLLA-Fasern mit glatter Oberfläche erhalten (Abbildungen 3.27). Der mittlere Faserdurchmesser beträgt  $1,51 \mu\text{m} \pm 0,85 \mu\text{m}$ . Es wurden unter gleichen Spinnbedingungen

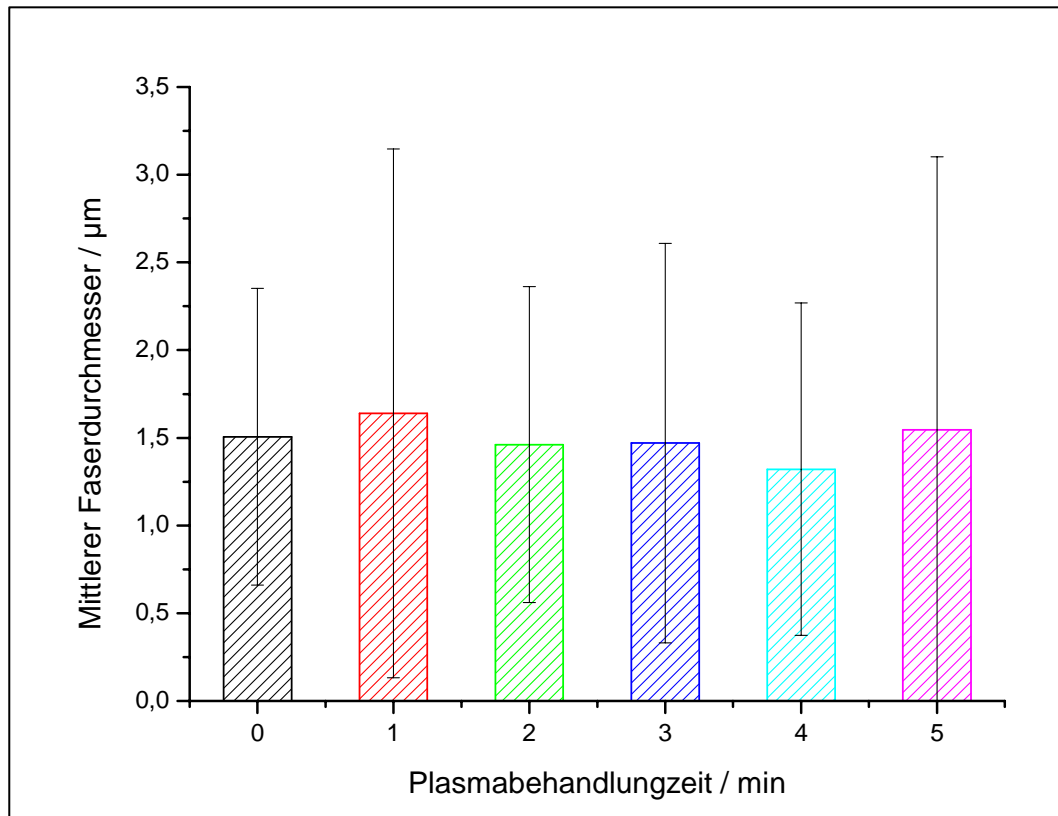
PLLA-Fasern auf Siliziumträgern für Kontaktwinkelmessungen hergestellt. Die Proben wurden einer Plasmabehandlungszeit von einer bis fünf Minuten unterzogen.

Die PLLA-Fasern mit unterschiedlicher Plasmabehandlungszeit wurden elektronenmikroskopisch untersucht.



**Abbildungen 3.28:** A- F) A) PLLA-Fasern mit 1 Minute Plasmabehandlung; B) PLLA-Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung; C) PLLA-Fasern mit 3 Minuten Plasmabehandlung; D) PLLA-Fasern mit 4 Minuten Plasmabehandlung; E und F) PLLA-Fasern mit 5 Minuten Plasmabehandlung;

Durch die elektromikroskopischen Untersuchungen kann beobachtet werden, dass mit längerer Plasmabehandlungszeit besonders Fasern unter einem Faserdurchmesser von einem Mikrometer geschmolzen und abgebaut werden. Diese schmelzen teilweise an die dickeren Fasern an (Abbildung 3.28 F). Es lässt sich weiterhin beobachten, dass es zu vermehrt von Faserwindungen kommt (Abbildung 3.28 E). Die Ursache könnte sein, dass durch das Schmelzen der Faseroberfläche sich die dünneren Fasern zusammen ziehen.



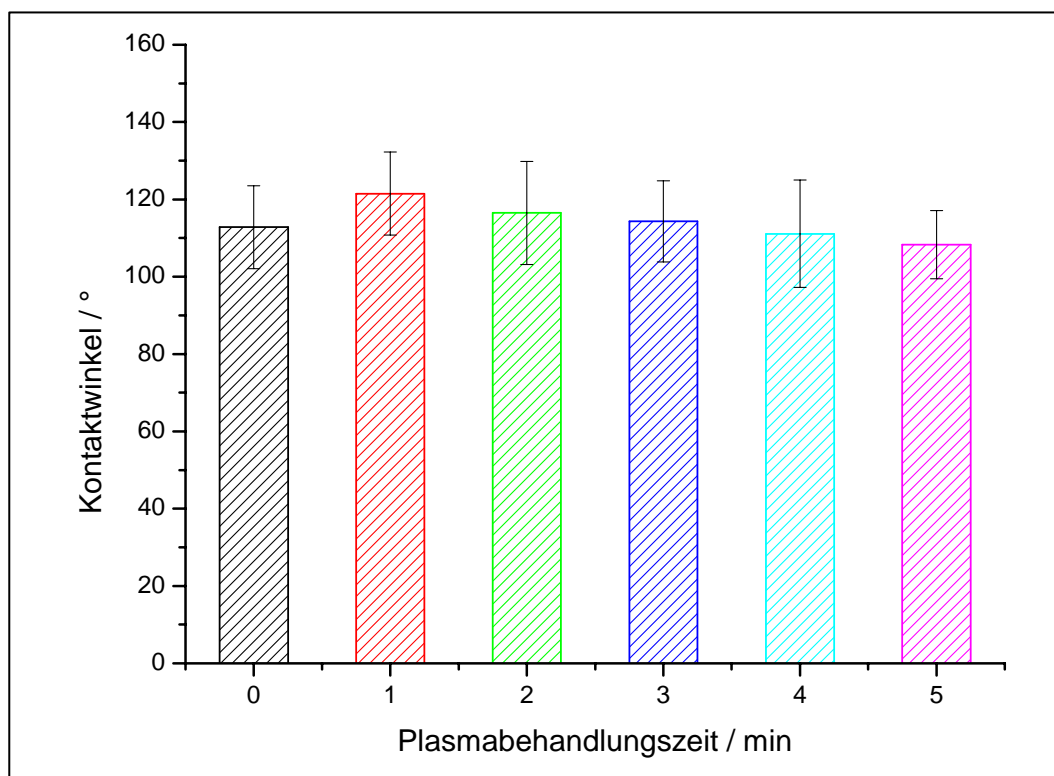
**Abbildung 2.29:** Mittlere Faserdurchmesser von PLLA-Fasern in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeiten (0 bis 5 Minuten)

Von den PLLA-Fasern mit unterschiedlicher Plasmabehandlungszeit wurden die mittleren Faserdurchmesser ausgewertet (Abbildung 2.29). Es kann zunächst eine hohe Faserdurchmesserverteilung beobachtet werden. Das kann jedoch nicht auf den Plasmaeinfluss zurückgeführt werden, denn der mittlere Faserdurchmesser wird nicht verändert.

Von den unterschiedlichen Proben wurden anschließend Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die plasmabehandelten PLLA-Fasern wurden vor den Kontaktwinkelmessungen im Exikator aufbewahrt. Danach wurden jeweils 20 Kontaktwinkelmessungen an den Fasern durchgeführt.

Folgende Kontaktwinkel wurden erhalten:

PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung:	$112,8^\circ \pm 10,7^\circ$
PLLA-Fasern mit 1 Minute Plasmabehandlung:	$121,5^\circ \pm 10,7^\circ$
PLLA-Fasern mit 2 Minute Plasmabehandlung:	$116,5^\circ \pm 13,3^\circ$
PLLA-Fasern mit 3 Minute Plasmabehandlung:	$114,3^\circ \pm 10,5^\circ$
PLLA-Fasern mit 4 Minute Plasmabehandlung:	$111,1^\circ \pm 13,9^\circ$
PLLA-Fasern mit 5 Minute Plasmabehandlung:	$108,3^\circ \pm 8,8^\circ$



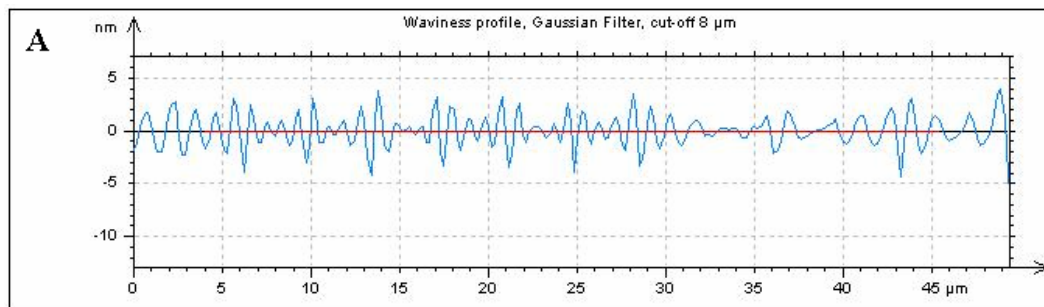
**Abbildung 3.30:** Statische Kontaktwinkel von PLLA-Fasern in Abhängigkeit der Plasmabehandlungszeiten (0 bis 5 Minuten)

Wie in Abbildung 3.30 zu sehen, wird die bereits hydrophobe Oberfläche von den unbehandelten PLLA-Fasern nach 1 Minute Plasmabehandlungszeit noch etwas hydrophober.

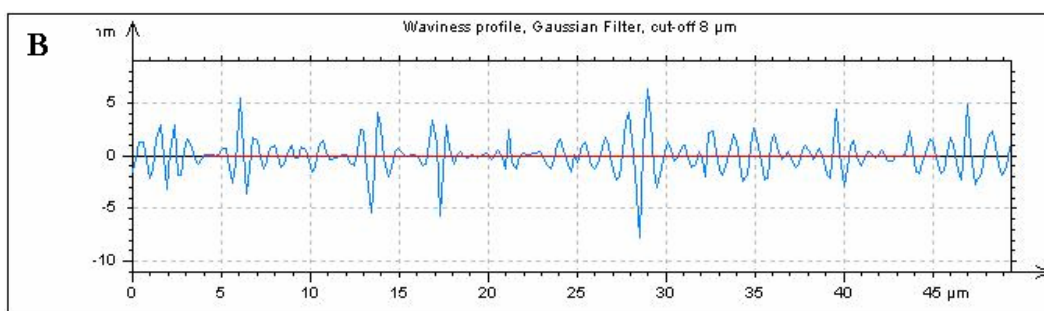
Mit weiterer Zunahme der Plasmabehandlungszeit nimmt jedoch die Hydrophilie zu. Nach 5 Minuten Plasmabehandlungszeit konnte nur unter erschwerten Bedingungen ein Kontaktwinkel gemessen werden. Ein zu schnelles Absetzen führte zum sofortigen Spreiten des Tropfens. Es konnte beobachtet werden, dass die Fasermatten mit hoher Plasmabehandlungszeit den Wassertropfen nach wenigen Minuten vollständig aufsogen. Damit gibt der Kontaktwinkel der unbehandelten PLLA-Fasern nur bedingt Aufschluß über das Benetzungsverhalten der Fasermatten.

### 3.1.3.1.2 Rasterkraftuntersuchungen von plasmabehandelten PLLA-Filmen

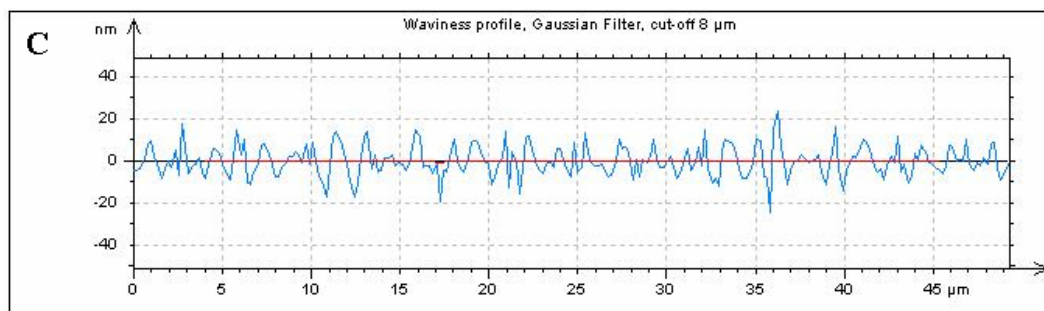
Die Untersuchung der Rauigkeit an der Faseroberfläche war mit den zu Verfügung stehenden Geräten nicht möglich. Deswegen wurden AFM-Untersuchungen an PLLA-Filmen durchgeführt. Dazu wurde über das Spin-Coating PLLA-Filme hergestellt und diese unterschiedlichen Plasmabehandlungszeiten unterzogen (0 bis 10 Minuten). Es wurden unterschiedliche Profile erhalten (Abbildungen 3.31 bis 3.41)



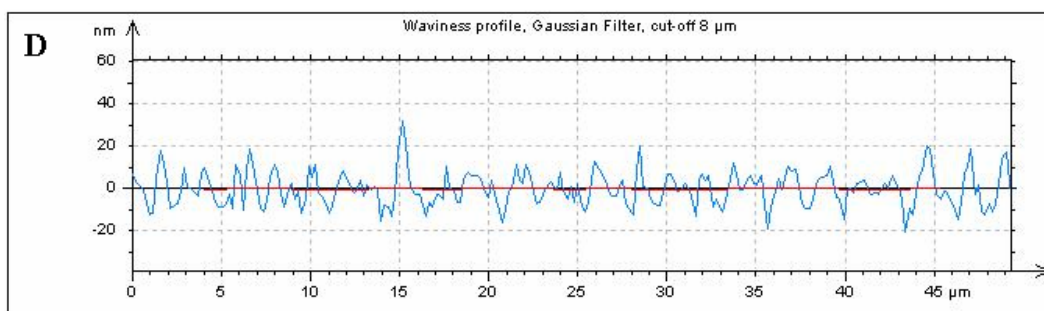
**Abbildung 3.31:** Gefiltertes Profil einer unbehandelten PLLA-Filmoberfläche



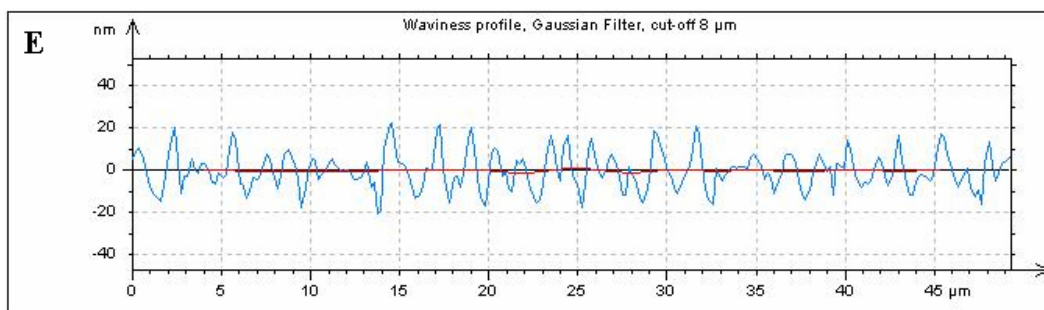
**Abbildung 3.32:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (1 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche



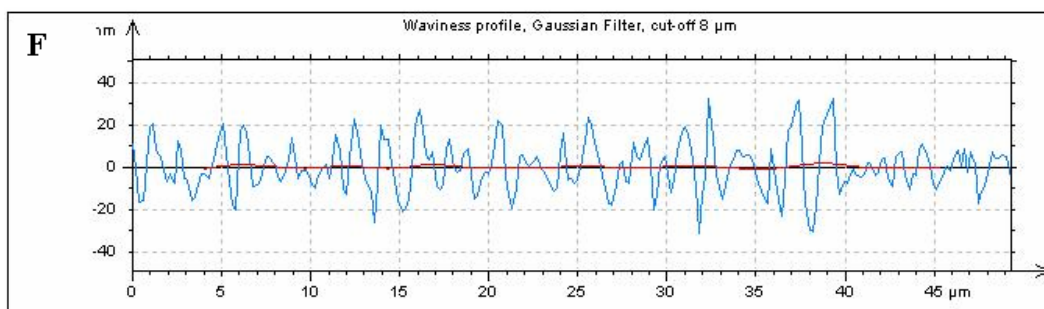
**Abbildung 3.33:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (2 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche



**Abbildung 3.34:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (3 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche

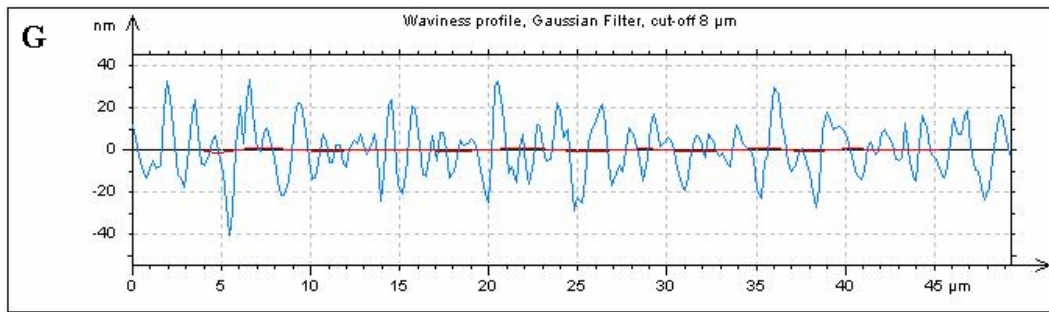


**Abbildung 3.35:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (4 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche

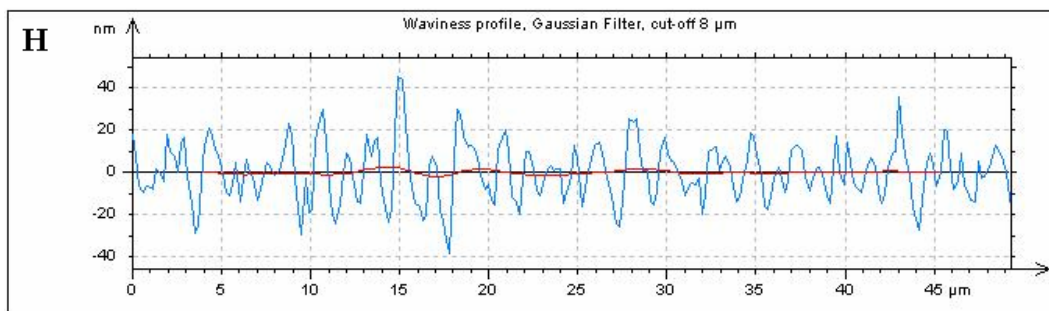


**Abbildung 3.36:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (5 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche

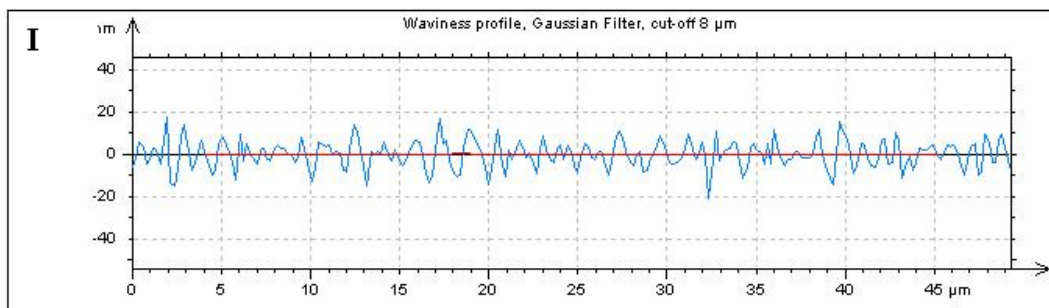




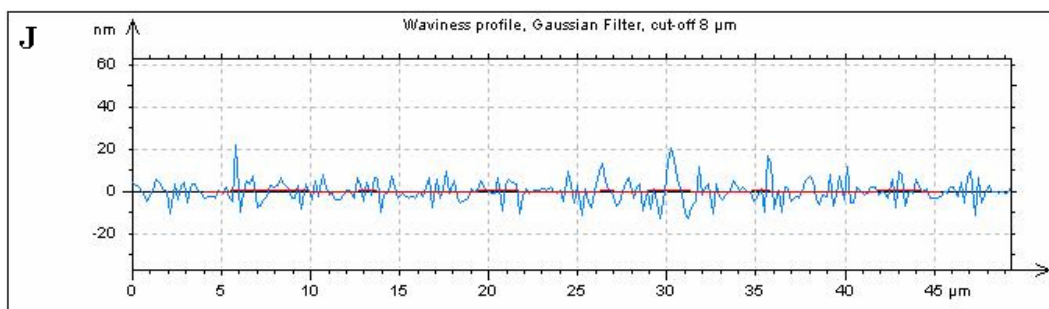
**Abbildung 3.37:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (6 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche



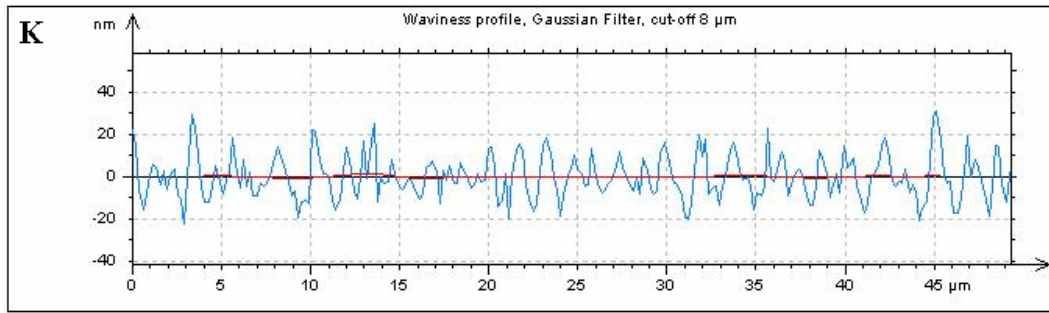
**Abbildung 3.38:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (7 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche



**Abbildung 3.39:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (8 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche

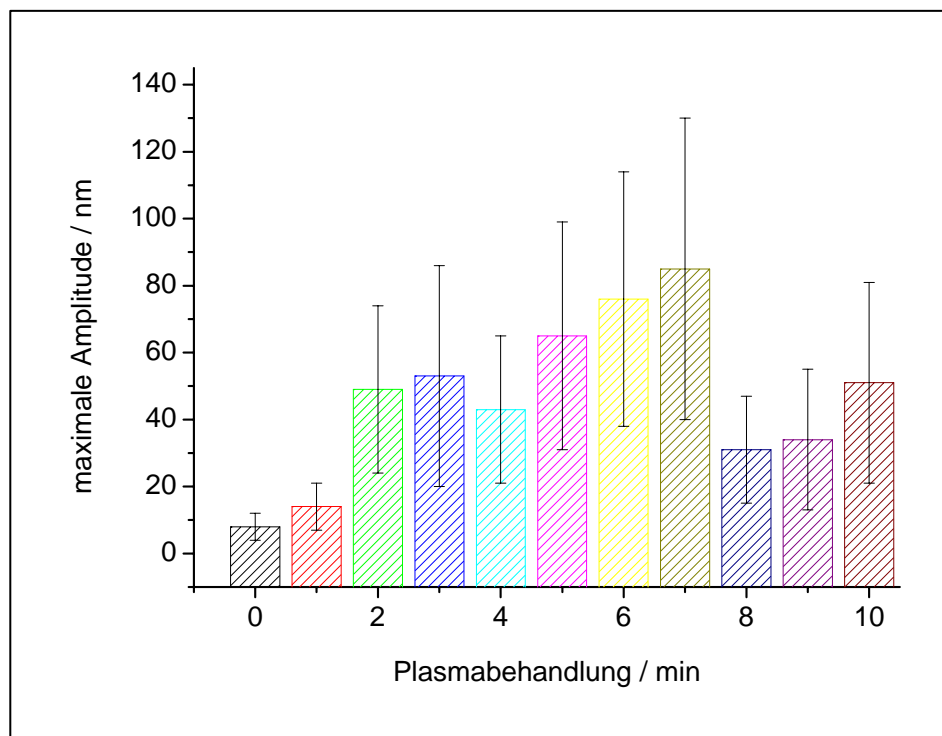


**Abbildung 3.40:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (9 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche



**Abbildung 3.41:** Gefiltertes Profil einer mit Sauerstoffplasma (10 Min.) behandelten PLLA-Filmoberfläche

An dieser Stelle soll keine quantitative Oberflächenanalyse durchgeführt werden sondern nur die einzelnen Amplituden der Profile miteinander verglichen werden.



**Abbildung 3.42:** Zunahme der Rauheit von PLLA-Filmen durch Plasmabehandlung

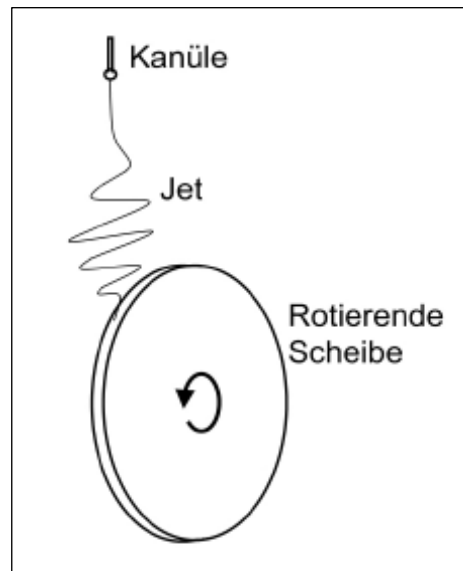
Mit steigender Plasmabehandlungszeit nimmt die Amplitude deutlich zu (Abbildung 3.42). Das bedeutet, dass die PLLA-Filme rauer werden. Nach sieben Minuten des Einflusses von Sauerstoffplasma nimmt die Amplitude deutlich ab. Es scheinen sich Glättungseffekte durch Materialabtragung eingestellt zu haben.



Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass durch geringe Plasmabehandlungszeiten die Rauigkeit und damit der Kontaktwinkel ansteigen. Nach längeren Plasmabehandlungszeiten treten Glättungseffekte auf und zudem werden mehr funktionelle Gruppen gebildet. Das resultiert in der Abnahme des Kontaktwinkels und damit in der Abnahme der Hydrophobie. Durch Zug-Dehnungsmessungen soll nun der Einfluss des Plasmas auf die mechanischen Eigenschaften von PLLA-Fasern festgestellt werden. Es soll der Elastizitätsmodul und die maximale Dehnung von orientierten PLLA-Fasern untersucht werden, sowie die Änderung nach einer Plasmabehandlungszeit von 2 und 5 Minuten.

#### 3.1.3.1.3 Zug-Dehnungsmessungen an orientierten PLLA-Fasern

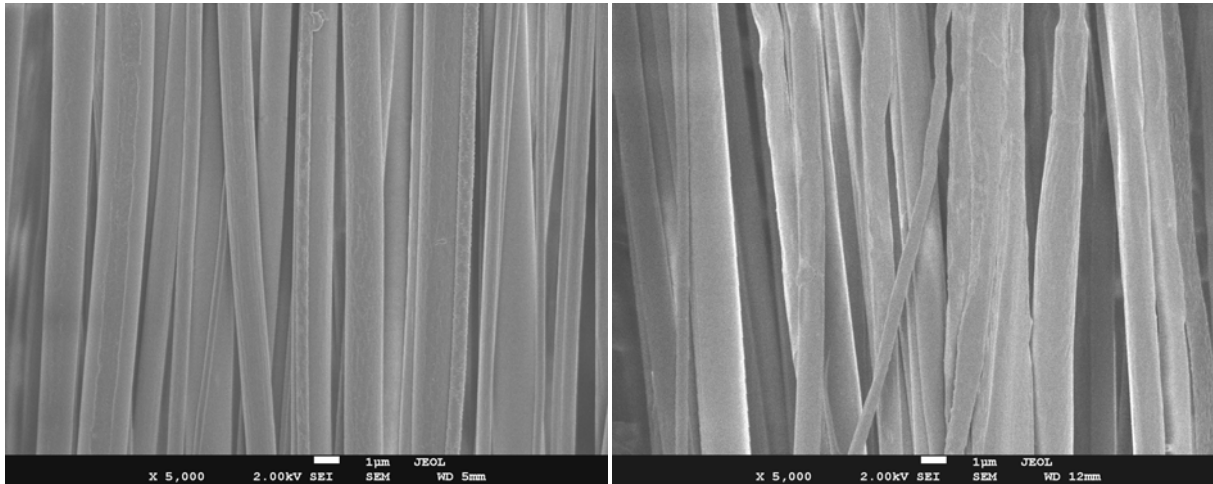
Zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften wurden PLLA-Fasern auf den Außenrand einer drehenden Scheibe hergestellt (Abbildung 3.43). Der Scheibenumfang beträgt dabei 60 cm und die Scheibendicke 1 cm. Es konnten glatte PLLA-Fasern bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 15 %, realisiert werden. Es wurden bei einer Drehzahl von 1000 Umdrehungen pro Minute PLLA-Fasern aufgesponnen.



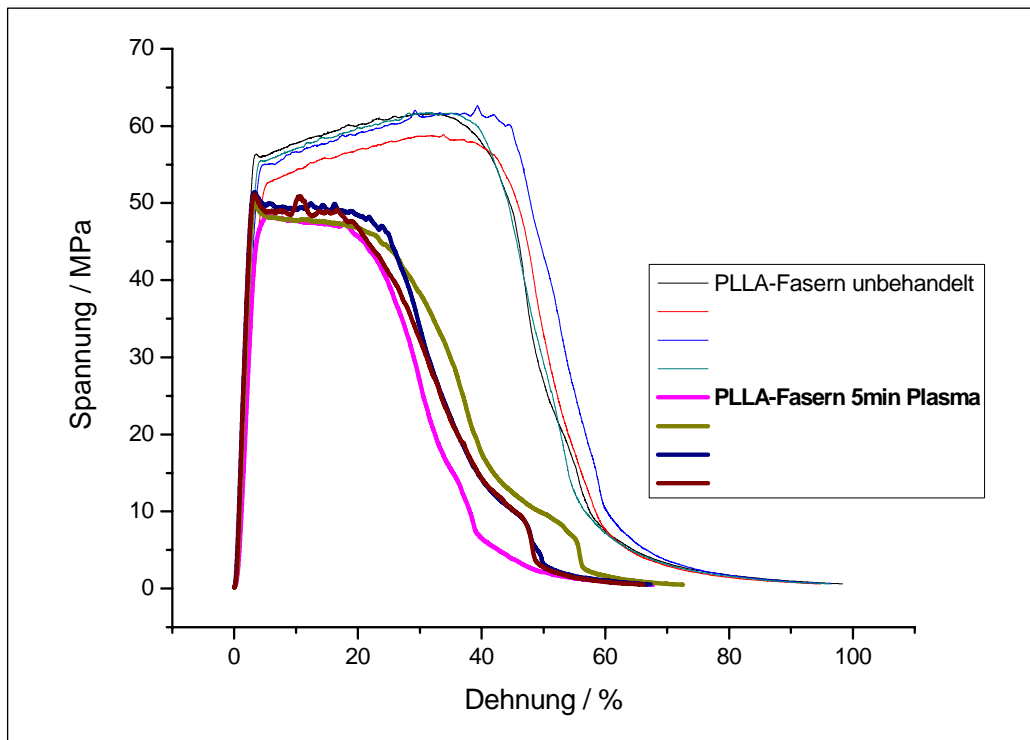
**Abbildung 3.43:** Schematische Darstellung einer rotierenden Scheibe als Kollektor<sup>[69]</sup>

Da der Scheibenumfang 60 cm beträgt, konnte ein Gesamtfaserband von 60 cm erhalten werden. Diese wurde in 5 cm lange Abschnitte geteilt. Da für jede Messung fünf gleiche

Proben verwendet werden sollen kann nur eine veränderte Faserprobe mit der Ausgangsprobe verglichen werden. Deswegen wurde zweimal mit gleicher Spinnndauer und Spinnparametern gesponnen. Im ersten Ansatz sollten die orientierten PLLA-Fasern einmal unbehandelt und einmal 5 Minuten plasmabehandelt untersucht werden. Zusätzlich wurden Siliziumträger angebracht, um die Orientierung im SEM festzustellen. Es wurden SEM-Aufnahmen von Fasern vor und nach der Plasmabehandlung durchgeführt. Die Fasern sind orientiert abgelegt worden, und somit konnten Zug-Dehnungsversuche durchgeführt werden.



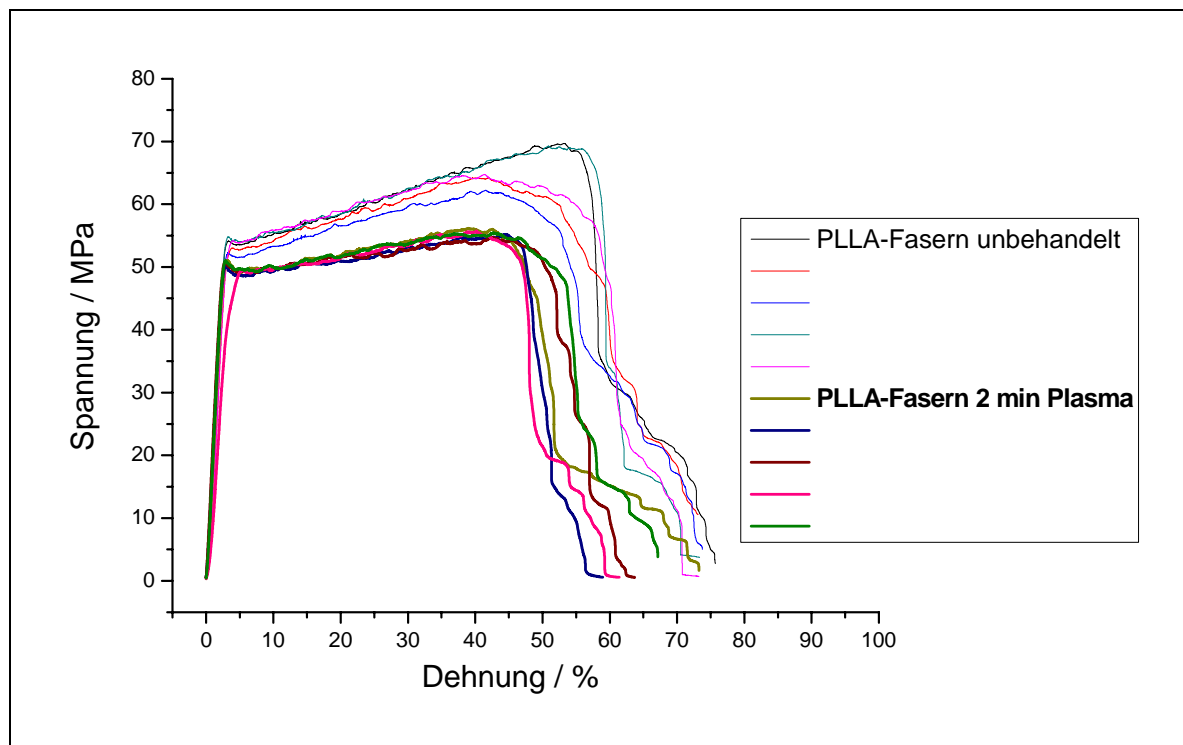
**Abbildungen 3.44:** A) Orientierte PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung  
B) Orientierte PLLA-Fasern nach 5 Minuten Plasmabehandlung



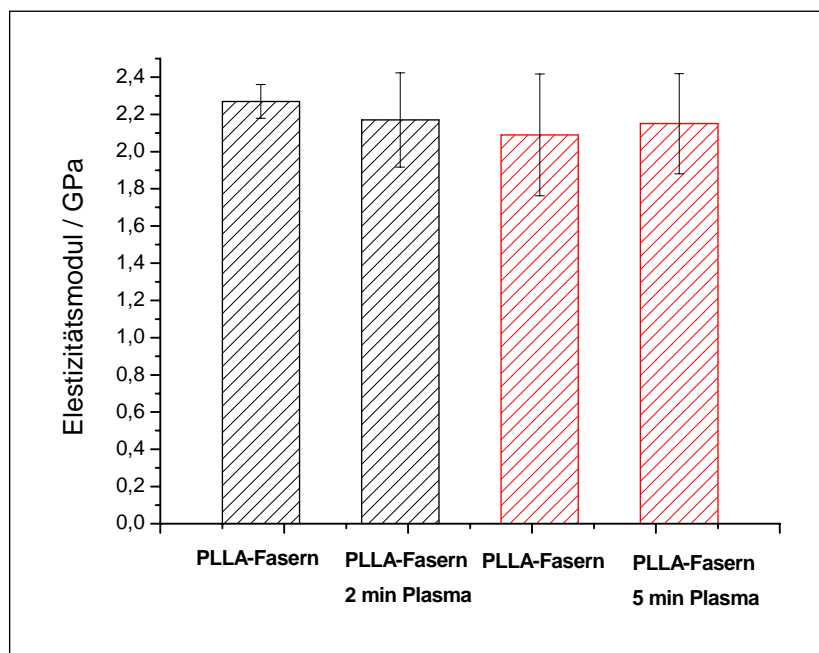
**Abbildung 3.45:** Abnahme der maximalen Dehnung bei PLLA-Fasern mit 5 Minuten Plasmabehandlung

In der Abbildung 3.45 kann man sehen, dass die maximale Dehnung bei den fünf Minuten plasmabehandelten Fasern abnimmt.

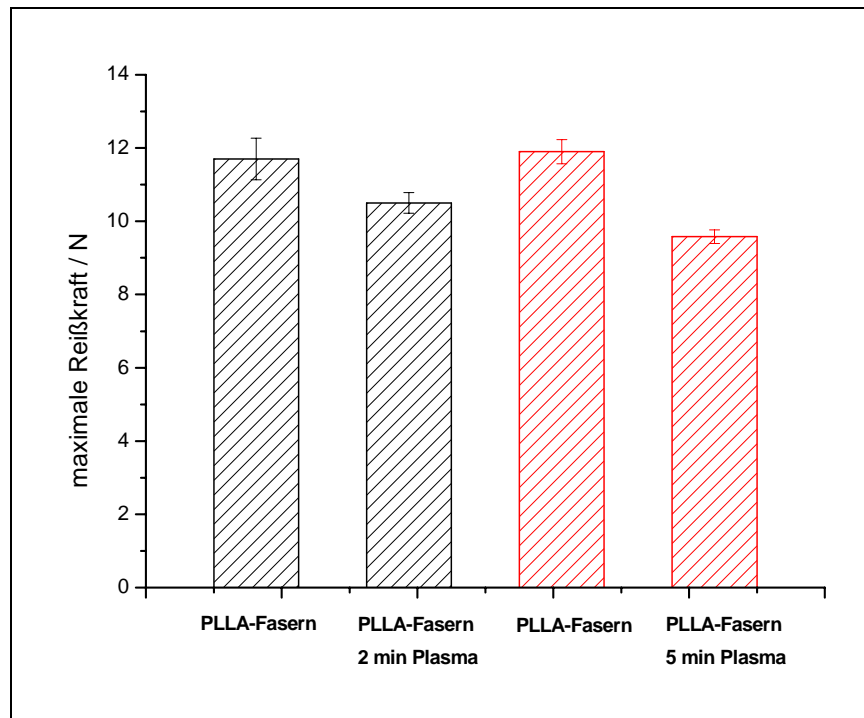
Im zweiten Ansatz wurden die Fasern zwei Minuten plasmabehandelt und die mechanischen Eigenschaften untersucht.



**Abbildung 3.46:** Geringere Abnahme der maximalen Dehnung bei PLLA-Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung



**Abbildung 3.47:** Kein signifikanter Einfluss des Sauerstoffplasmas auf das Elastizitätsmodul



**Abbildung 3.48:** Signifikanter Einfluss des Sauerstoffplasmas auf die maximale Reißkraft

Die plasmabehandelten PLLA-Faserbänder zeigen einen Verlust der mechanischen Stabilität auf. Es ändert sich signifikant die maximale Zuglast (Abbildung 3.48). Die Steifigkeit dagegen wird erhalten. In den Tabellen 3.1 bis 3.6 sind die einzelnen Messwerte zu den Zug-Dehnungsversuchen vorhanden.

**Tabelle 3.1:** 1. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung

Anzahl	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_m$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
1	2,45	12,0	61,68	29,1
2	1,66	11,6	58,90	33,8
3	2,10	12,4	62,65	39,3
4	2,17	11,6	61,72	31,0

( $E_{\text{mod}}$  = Elastizitätsmodul;  $F_{\text{max}}$  = maximale Reißkraft;  $\sigma_m$  = maximale Spannung;

dL at  $F_{\text{max}}$  = Dehnung bei maximaler Reißkraft)

**Tabelle 3.2:** 1. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung

(Mittelwerte und Standardabweichung):

Parameter	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_M$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
Mittelwert	2,09	11,9	61,24	33,3
Standard- Abweichung	0,327	0,395	1,62	4,4

**Tabelle 3.3:** 1. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern nach 5 Minuten Plasmabehandlung:

Anzahl	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_m$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
1	1,75	9,32	48,39	5,4
2	2,23	9,61	49,90	3,3
3	2,28	9,64	51,40	3,3
4	2,34	9,76	51,09	3,3

**Tabelle 3.4:** 1. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern nach 5 Minuten Plasmabehandlung

(Mittelwerte und Standardabweichung):

Parameter	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_M$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
Mittelwert	2,15	9,58	50,20	3,8
Standard- abweichung	0,269	0,186	1,37	1,0

**Tabelle 3.5:** 2. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung:

Anzahl	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_m$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
1	2,17	11,4	64,30	42,0
2	2,22	11,3	62,23	41,6
3	2,38	12,1	69,27	50,9
4	2,25	11,3	64,78	41,4
5	2,35	12,6	69,71	53,3

( $E_{\text{mod}}$  = Elastizitätsmodul;  $F_{\text{max}}$  = maximale Reißkraft;  $\sigma_m$  = maximale Spannung;

dL at  $F_{\text{max}}$  = Dehnung bei maximaler Reißkraft)

**Tabelle 3.6:** 2. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung  
(Mittelwerte und Standardabweichung):

Parameter	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_M$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
Mittelwert	2,27	11,7	66,06	45,8
Standard- Abweichung	0,0913	0,567	3,28	5,8

**Tabelle 3.7:** 2. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern nach 2 Minuten Plasmabehandlung:

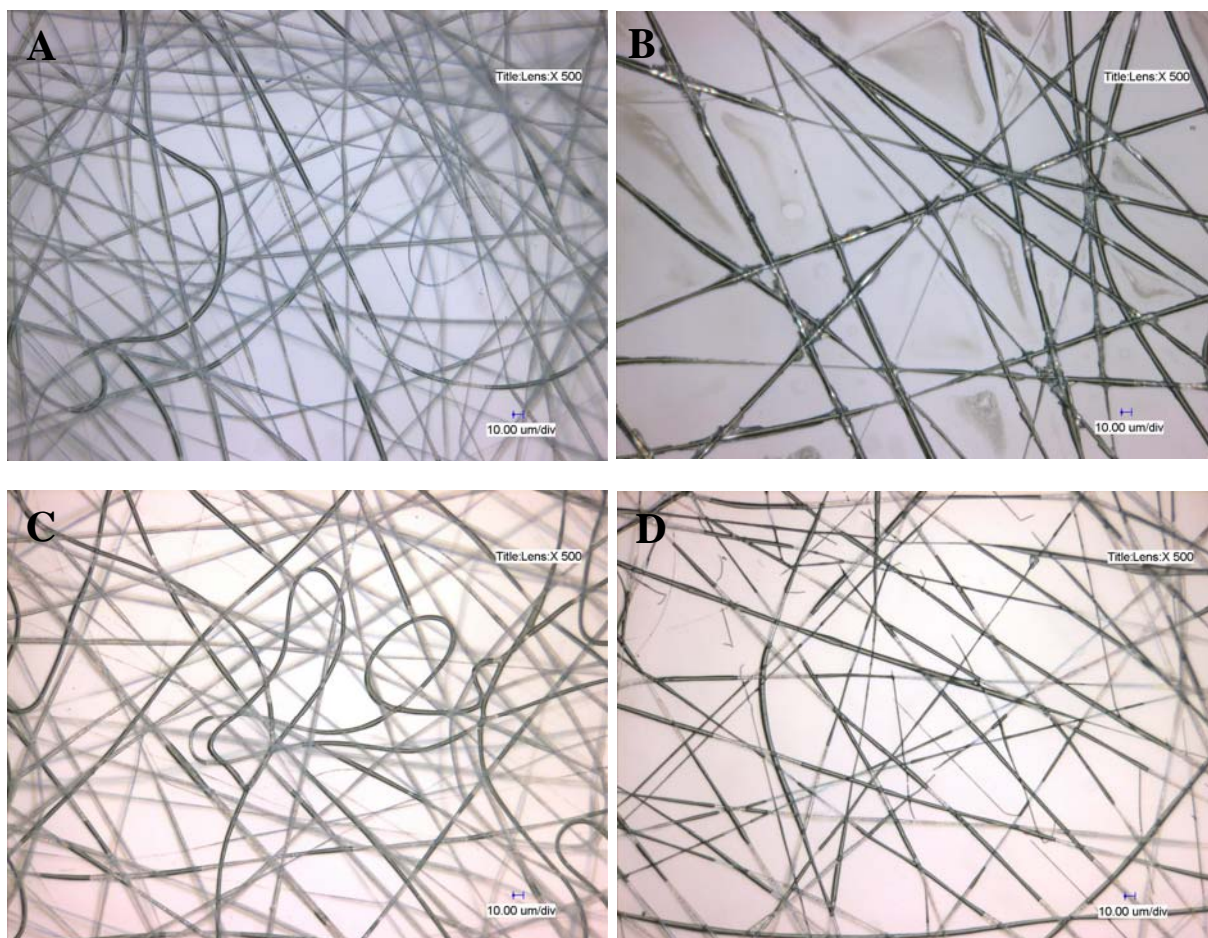
Anzahl	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_m$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
1	2,26	10,3	55,19	44,4
2	2,29	10,4	54,71	42,6
3	1,72	10,7	55,75	40,2
4	2,32	10,1	55,44	42,7
5	2,26	10,8	56,18	39,0

**Tabelle 3.8:** 2. Ansatz: Orientierte PLLA-Fasern nach 2 Minuten Plasmabehandlung  
(Mittelwerte und Standardabweichung):

Parameter	$E_{\text{mod}}$ / GPa	$F_{\text{max}}$ / N	$\sigma_M$ / MPa	dL at $F_{\text{max}}$ / %
Mittelwert	2,17	10,5	55,45	41,8
Standard- abweichung	0,253	0,281	0,56	2,1

### 3.1.3.1.4 Löslichkeitsstudien an plasmabehandelten PLLA-Fasern

Aufgrund eines Lösungsmittel- und Trennsäulenproblems war es nicht möglich den Kettenabbau der plasmabehandelten PLLA-Fasern über die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) zu verfolgen. Stattdessen wurde anhand der optischen Mikroskopie versucht Aussagen über ihre Stabilität nach der Plasmabehandlung zu bekommen. Dazu wurden PLLA-Fasern auf Glaträger gesponnen und anschließend mit Sauerstoffplasma behandelt.



**Abbildungen 3.49:** A-D) PLLA-Fasern mit Plasmabehandlung und anschließend zwei Stunden im 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Puffer gelöst

- A) 4 Minuten Plasmabehandlung    B) 4 Minuten Plasmabehandlung und lösen  
C) 5 Minuten Plasmabehandlung    D) 5 Minuten Plasmabehandlung und lösen

Es wurden Zeiten zwischen einer und fünf Minuten gewählt. Anschließend wurden die Fasern in 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure(MES)-Puffer für zwei Stunden eingelegt und danach getrocknet. Bei den Proben mit vier und fünf Minuten Plasmabehandlung wurde deutliches

Lösen besonders von „dünneren“ PLLA-Fasern beobachtet. Auch die „dickeren“ Fasern zeigen deutliches Anlösen an (Abbildung 3.49 B). Bei den Fasern mit fünf Minuten Plasmabehandlung wurden sogar Faserbruchstücke festgestellt (Abbildung 3.49 D).

### **3.1.3.2 Immobilisierung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche**

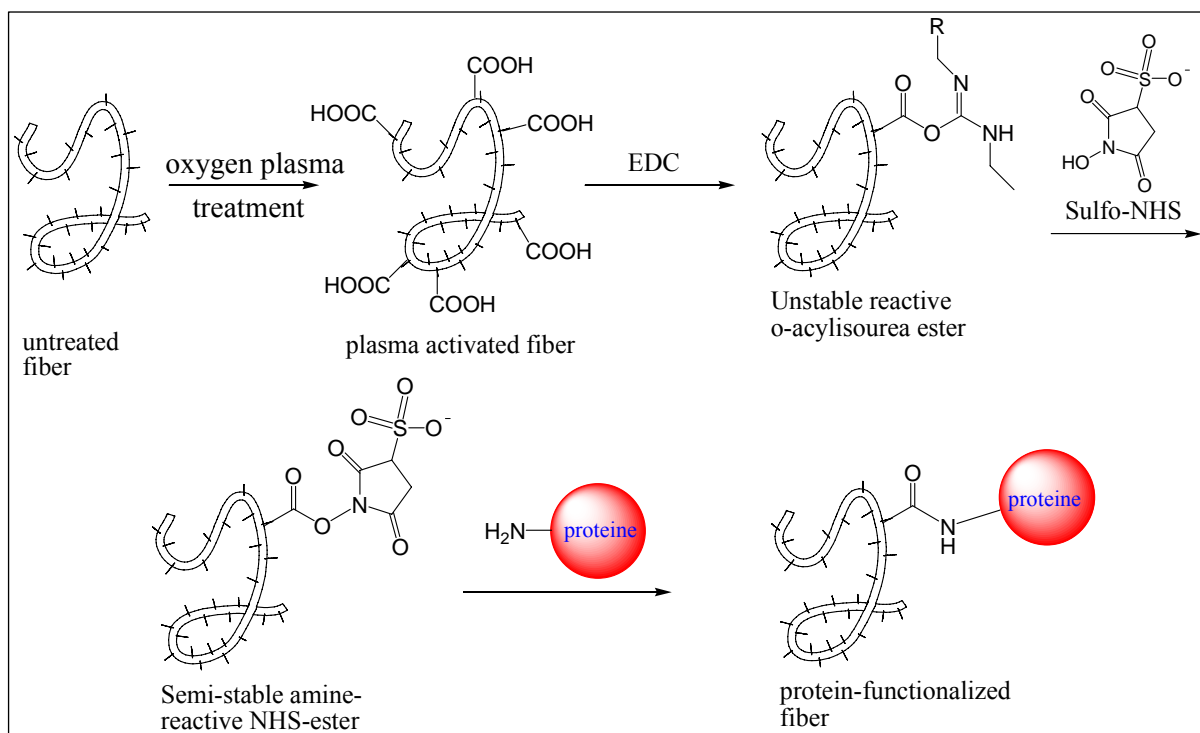
Um die zyklischen RGD-Peptide zu immobilisieren wurde zunächst mit Alexa 555 Hydrazid und FITC-RGD als Modellsystem gearbeitet. Es wurde ein Kopplungsprotokoll entwickelt, indem der pH-Wert, die Kopplungszeiten, die Kopplungschemikalien und die richtigen Temperaturen optimiert wurden. Die Immobilisierung sollte so gestaltet werden, dass der letzte Kopplungsschritt universell einsetzbar ist, d.h. dass alle Verbindungen mit einer primären Aminogruppe gekoppelt werden können.

#### **3.1.3.2.1 Immobilisierung von zyklischen RGD-Peptiden**

Für die Funktionalisierung von Fasern werden zunächst glatte PLLA-Fasern auf runde sterile Glasplättchen gesponnen. Wie in der Abbildung 3.50 zu sehen werden die Fasern mit Plasma behandelt, um Carboxylgruppen zu generieren. Die plasmaaktivierten PLLA-Fasern werden in einer Reaktionslösung aus EDC und Sulfo-NHS inkubiert, um einen nicht stabilen o-Acylisoureaester zu bilden. Dieser ist hydrolyseempfindlich und kann leicht von Wassermolekülen angegriffen werden, um dann wieder die ursprünglichen Carboxylgruppen zu bilden. Deswegen soll das reaktive Sulfo-NHS eine semi-stabile aminreaktive Zwischenstufe bilden.

An dieser Stelle können Peptide, Proteine oder Katalysatoren mit einer primären Aminogruppe eingesetzt werden, um an den Sulfo-NHS-Ester und damit an die Faseroberfläche zu binden. In diesem Fall werden zyklische RGD-Peptide immobilisiert. Dazu wird in einer zyklischen RGD-Lösung für sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den elektrophilen Angriff des freien Elektronenpaares einer primären Aminogruppe des zyklischen Peptids (Lysin) kann eine stabile Amidbindung gebildet werden. Damit kann eine Faseroberfläche erfolgreich Peptidfunktionalisiert werden.

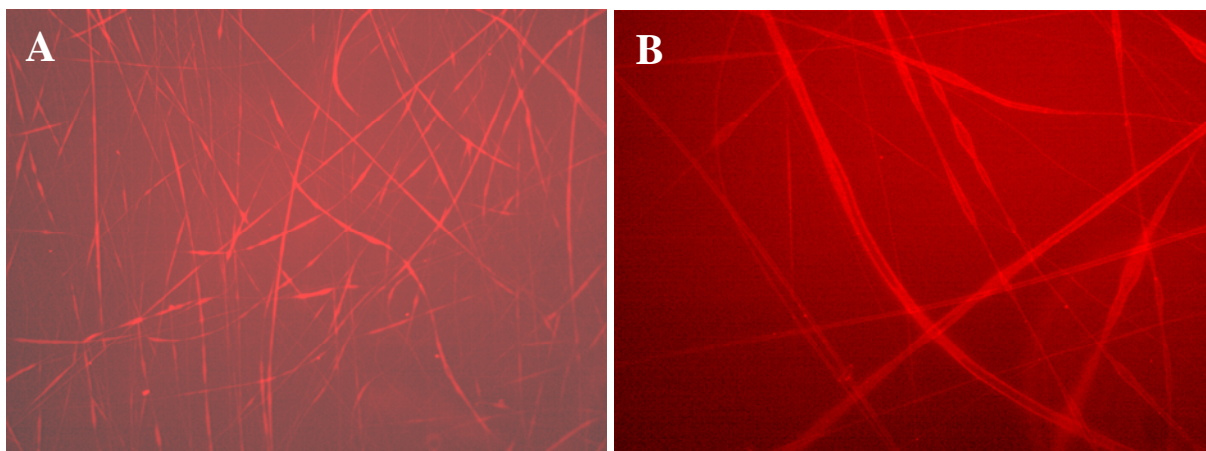




**Abbildung 3.50:** Verlauf der einzelnen Schritte im Kopplungsprotokoll zur Anbindung von Proteinen oder Peptiden an die Faseroberfläche

### 3.1.3.2.2 Immobilisierung von Alexa 555 Hydrazid

Als Testmolekül wurde wie beschrieben der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 555 Hydrazid ausgewählt. Dieses bindet mit seiner reaktiven Hydrazingruppe ( $-\text{NH}-\text{NH}_2$ ) an die aktivierte Faseroberfläche.



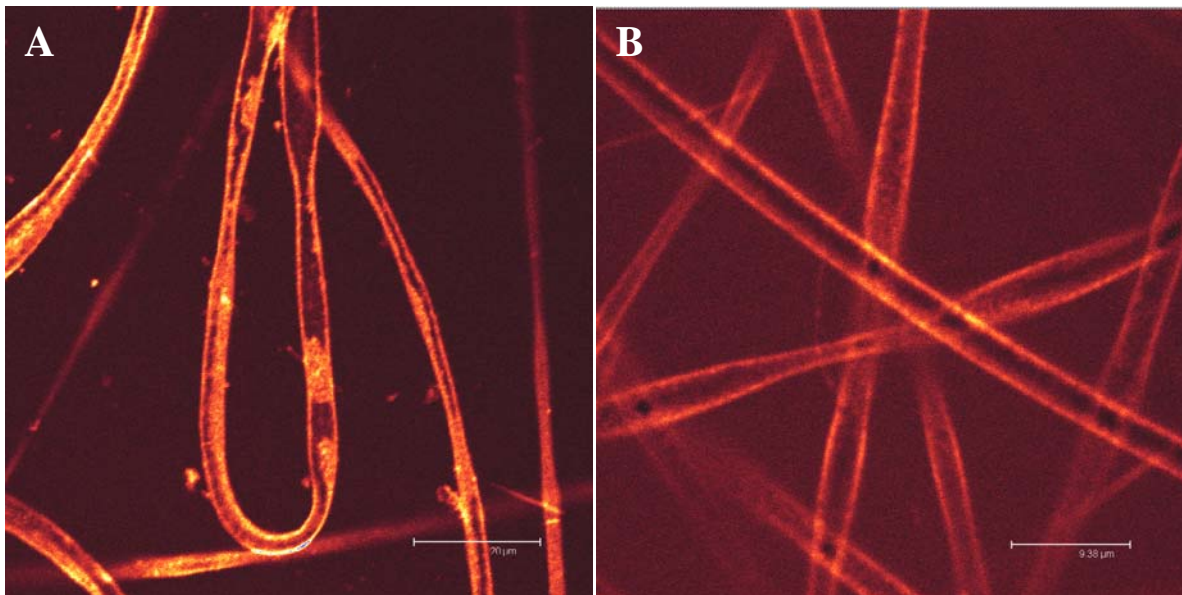
**Abbildungen 3.51:** A-B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PLLA-Fasern mit immobilisierten Alexa 555 Hydrazid

In den Abbildungen 3.51 A-B) sieht man eine deutliche Fluoreszenz des angebundenen Alexa 555 Hydrazids. Die Faseroberfläche fluoresziert rot und zeigt eine erfolgreiche Anbindung an.

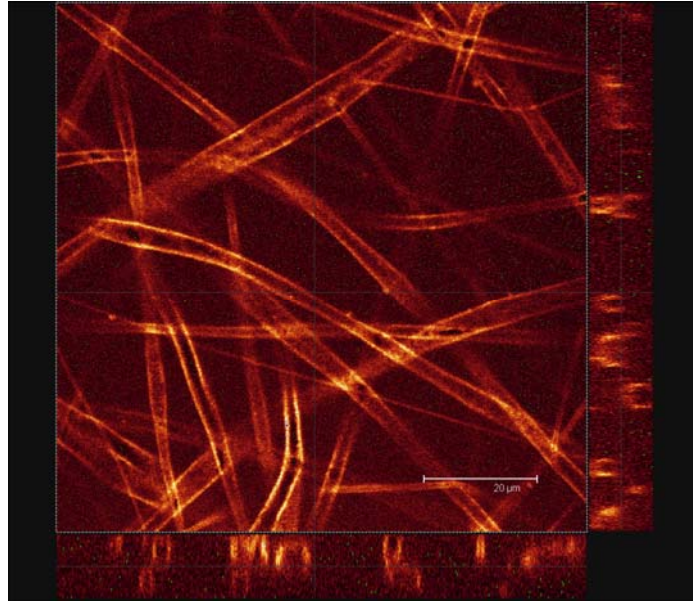
#### 3.1.3.2.3 Immobilisierung von FITC-RGD

In den weiteren Versuchen wurde mit dem kommerziell erhältlichen FITC-RGD gearbeitet. Das Chromophor FITC ist dabei an ein lineares RGD-Peptid kovalent gebunden. Das lineare RGD-Peptid besteht aus den Aminosäuren Leucin, Cystein, Glycin, Arginin, Glycin, Asparaginsäure, Serin und Prolin. Die primäre Aminogruppe von Arginin kann beispielsweise an die aktivierte Faseroberfläche binden.

Für bessere Untersuchungen der Oberflächenfluoreszenz wurde das konfokale Fluoreszenzmikroskop verwendet. Es wurde eine deutliche Fluoreszenzintensität auf der Faseroberfläche festgestellt. Dagegen wurde im Faserkern, wie erwartet, keine Fluoreszenz beobachtet (Abbildungen 3.52 A-B).



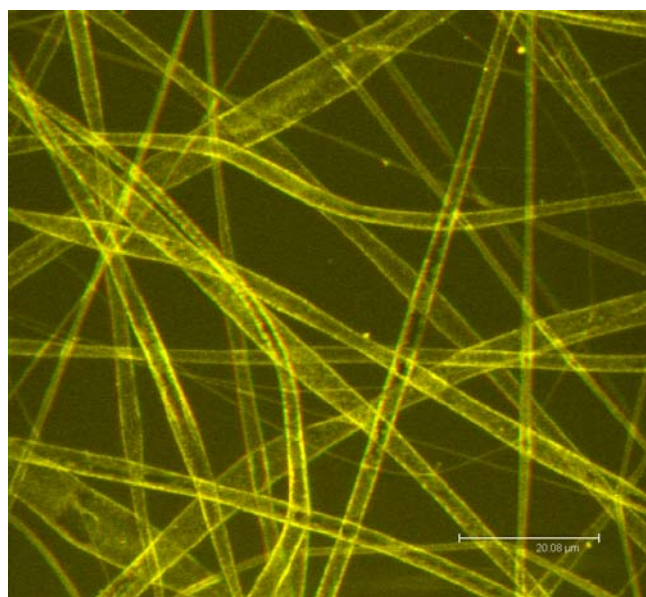
**Abbildungen 3.52:** A-B) FITC-RGD auf PLLA-Fasern immobilisiert



**Abbildung 3.53:** Draufsicht und Seitenansicht einer mit FITC-RGD gekoppelten Fasermatte

Im konfokalen Fluoreszenzmikroskop konnten tatsächlich Kern-Schale Strukturen beobachtet werden. Dabei sollte sich die Hülle aus einer Monolage der angebundenen Moleküle aufbauen. In der „Seitenansicht“ der zusammengesetzten konfokalen Bilder sieht man sichel- und kreisförmige Fluoreszenz auf der Faseroberfläche (Abbildung 3.53). Dagegen ist keine Fluoreszenz im Faserkern vorhanden.

In der folgenden Abbildung 3.54 sind alle aufgenommenen konfokalen Bilder einer 10 µm tiefen Messreihe in die FITC-RGD angebundene Fasermatte überlagert. Es bietet sich so die Möglichkeit in die Fasermatte „reinzusehen“.



**Abbildung 3.54:** 3 D-Scan (10 µm) durch eine FITC-RGD gekoppelten Fasermatte

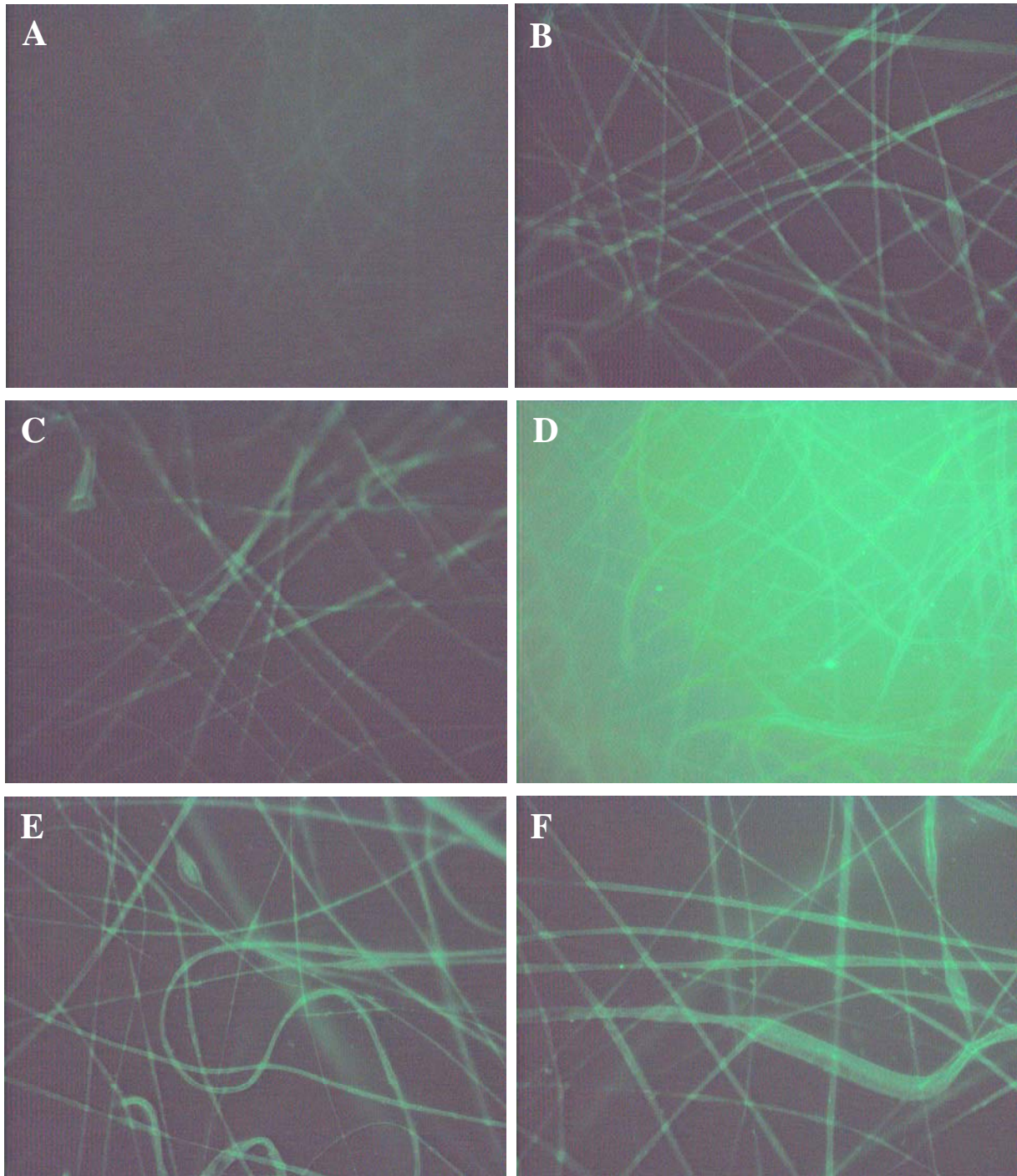
#### **3.1.3.2.4 Untersuchungen zur Kopplungsqualität**

Zur Untersuchung der Kopplungsqualität wurden unterschiedliche Immobilisierungszeiten von 6 Stunden und 24 Stunden verwendet. Um eine Aussage über die Effektivität des Kopplungsprozesses zu treffen wurde die Wechselwirkung von FITC-RGD auf unterschiedlich modifizierten PLLA-Oberflächen bestimmt. Dazu wurden folgende PLLA-Fasern erzeugt.

- a) PLLA-Fasern ohne Sauerstoffplasmabehandlung
- b) PLLA-Fasern mit Sauerstoffplasmabehandlung
- c) PLLA-Fasern mit Sauerstoffplasmabehandlung nur Sulfo-NHS
- d) PLLA-Fasern mit Sauerstoffplasmabehandlung nur EDC
- e) PLLA-Fasern mit Sauerstoffplasmabehandlung und EDC/Sulfo-NHS

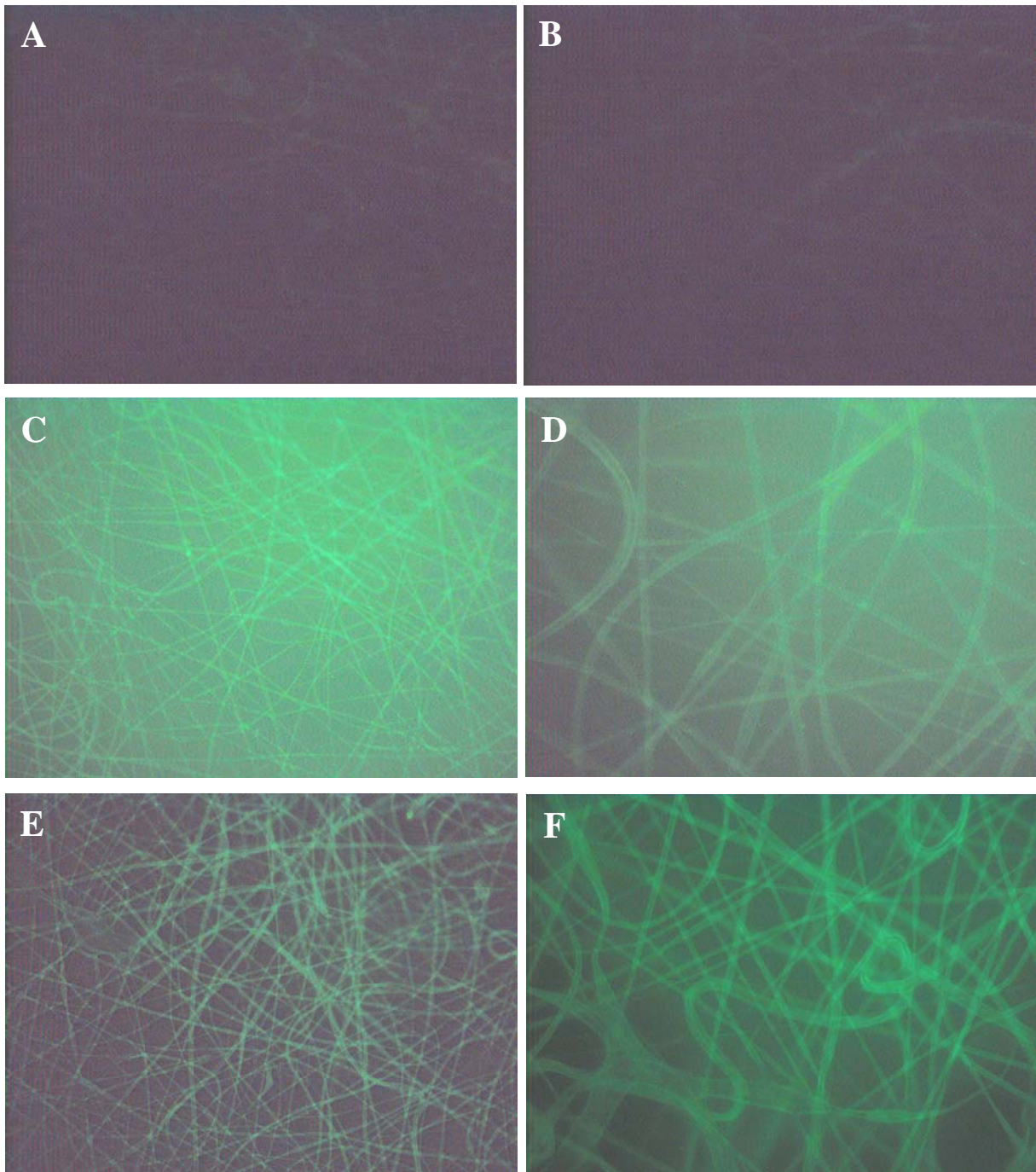


**24 Stunden immobilisiert**



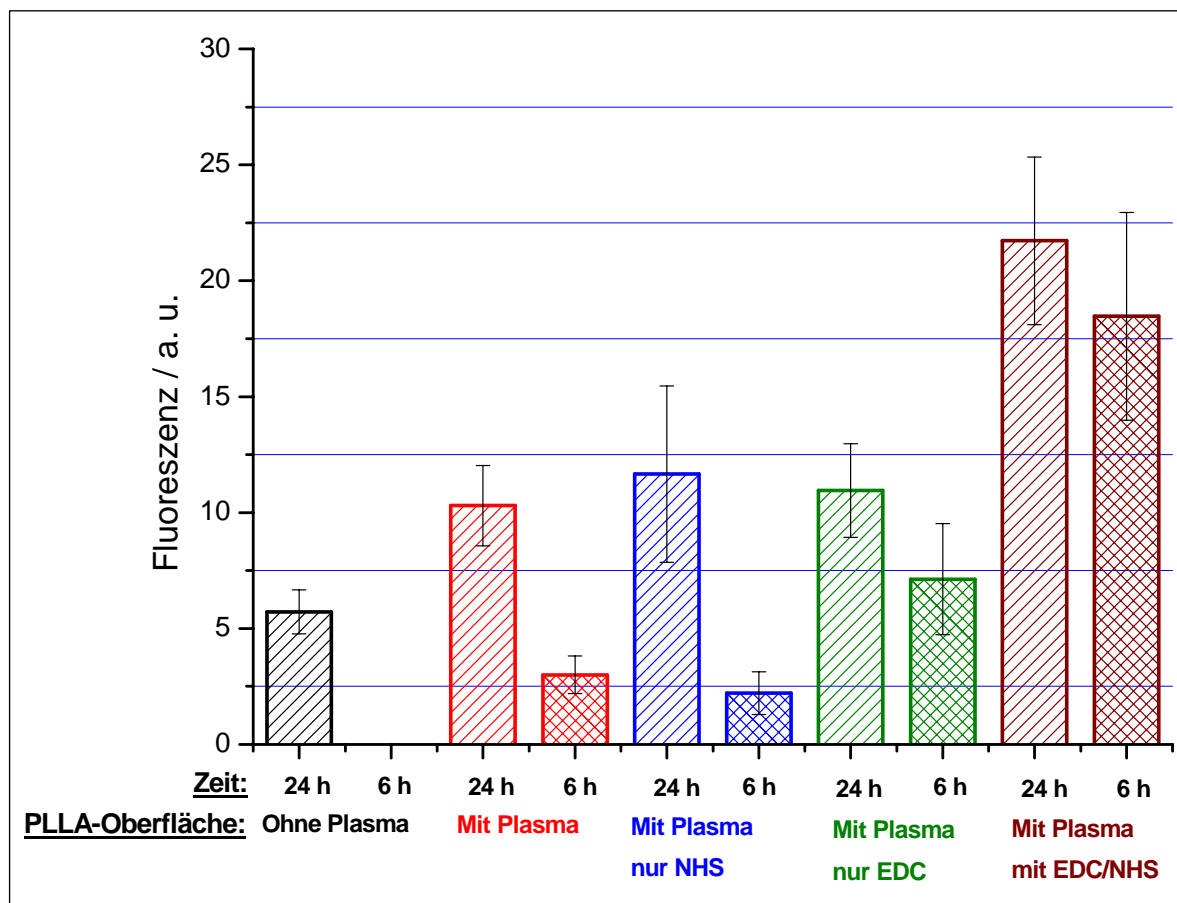
**Abbildungen 3.55:** A-F): A) FITC-RGD auf Fasern ohne Plasmabehandlung B) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung C) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und Sulfo-NHS D) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und EDC E/F) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und EDC/Sulfo-NHS

**6 Stunden immobilisiert**



**Abbildungen 3.56** A-F): A) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung B) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und Sulfo-NHS C/D) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und EDC E/F) FITC-RGD auf Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung und EDC/Sulfo-NHS

Fasern mit EDC/Sulfo-NHS-Aktivierung weisen einen viel höheren Grad an Fluoreszenz auf (Abbildungen 3.55 E-F und Abbildungen 3.56 E-F). Deutlich geringer ist die Intensität an Fluoreszenz mit EDC allein als Kopplungsreagenz (Abbildung 3.55 D und Abbildungen 3.56 D).



**Abbildung 3.57:** Intensität der Fluoreszenz in Abhängigkeit der unterschiedlichen Kopplungsbedingungen

Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität auf den unterschiedlich modifizierten PLLA-Faseroberflächen lassen sich Aussagen über die bestehenden Wechselwirkungen treffen (Abbildung 3.57). Auf der Faseroberfläche ohne Plasmabehandlung werden keine funktionellen Gruppen erzeugt. Es können deswegen nur relativ schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen der Faseroberfläche und dem FITC-RGD-Molekülen auftreten. Es können Van-der-Waals-Wechselwirkungen ausgebildet werden, dass führt zur schwachen physikalischen Anbindung nach 24 Stunden Immobilisierungszeit. Nach 6 Stunden sind dagegen die schwach angebundenen FITC-RGD-Moleküle mit PBS abgewaschen worden und es tritt keine Fluoreszenz oder eine nicht mehr zu messende Fluoreszenzintensität auf.



Die Faseroberfläche mit zwei Minuten Plasmabehandlung ohne Kopplungsreagenzien zeigt nach 24 Stunden Immobilisierungszeit eine doppelt so starke Fluoreszenzintensität auf. Durch die gebildeten Carboxylgruppen auf der PLLA-Oberfläche wird vor allem eine negativ geladene Oberfläche erhalten. Es kommt zu einer ionischen Bindung zwischen der negativ geladenen Oberfläche und den positiv geladenen Aminosäuren des FITC-RGD. Nach sechs Stunden kann eine viel geringere Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Es konnten in den 18 Stunden weniger Immobilisierungszeit auch nur etwa ein Viertel der ionischen Bindungen ausgebildet werden. Eine ähnliche Beobachtung kann bei der Faseroberfläche mit zwei Minuten Plasmabehandlung und Sulfo-NHS festgestellt werden. Sulfo-NHS kann nur zusammen mit EDC eingesetzt werden, da das Sulfo-NHS nur dann eine semi-stabile aminreaktive Zwischenstufe bilden kann, wenn EDC vorher mit den Carboxylgruppen reagiert und den o-Acylisoureaester bildet. Nach sechs Stunden Immobilisierungszeit nimmt, wie zu erwarten, die Fluoreszenzintensität ab.

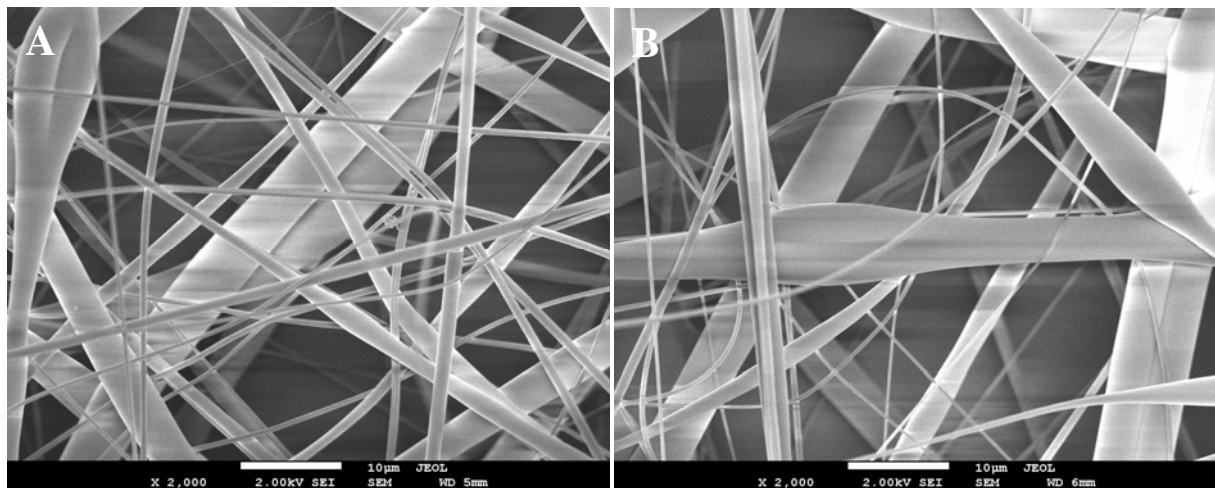
PLLA-Fasern mit Plasmabehandlung und EDC zeigen eine vergleichbare Fluoreszenzintensität auf wie mit Sulfo-NHS und ohne Kopplungsreagenzien. Das zeigt vor allem, wie wenig stabil der durch EDC gebildete o-Acylisoureaester ist. So kann die Hydrolyse des o-Acylisoureaester zu Carboxylgruppen stattfinden. Das Gleichgewicht ist eindeutig Richtung Hydrolyse gerichtet und es findet weniger eine Bildung einer stabilen Peptidbindung mit FITC-RGD statt. Nach sechs Stunden kann jedoch mit EDC eine dreifach bessere Anbindung erzielt werden als ohne EDC.

Die PLLA-Fasern mit Sauerstoffplasmabehandlung und anschließender EDC/Sulfo-NHS-Behandlung zeigen eindeutig die höchste Fluoreszenzintensität und damit die höchste Kopplungsgüte. Auch nach sechs Stunden Immobilisierungszeit sind weit mehr FITC-RGD-Moleküle angebunden worden als bei den anderen Behandlungsmethoden. Für alle weiteren Immobilisierungsversuche wurde eine Zeit von sechs Stunden und die Kombination EDC/Sulfo-NHS gewählt.



### 3.1.3.3 Kultivierung von hMSC auf Fasermatrices mit immobilisierten RGD-Peptiden an der Faseroberfläche

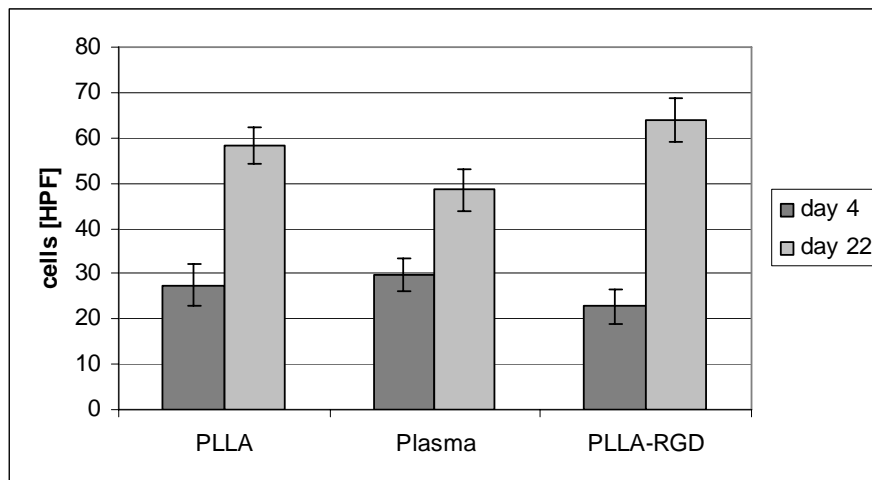
Für die Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen wurden PLLA-Fasern aus einer vier wt % PLLA-Lösung hergestellt. Die Spinnparameter konnten so gewählt werden, dass glatte PLLA-Fasern generiert wurden. Etwa 150 sterile runde Glasplättchen wurden mit den Fasern besponnen und für die Zellversuche präpariert. Drei verschiedene Fasertypen konnten generiert werden. Zunächst sollten Fasern ohne Plasmabehandlung eingesetzt werden. Als Zweites wurden die gleichen Fasern zwei Minuten mit Sauerstoffplasma behandelt. Als Drittes wurde die gleiche Plasmabehandlungszeit gewählt und gemäß den vorher bestimmten Kopplungsparametern mit den zyklischen RGD-Peptiden immobilisiert. SEM-Untersuchungen zeigten die gewünschte glatte Faseroberfläche (Abbildungen 3.58 A-B).



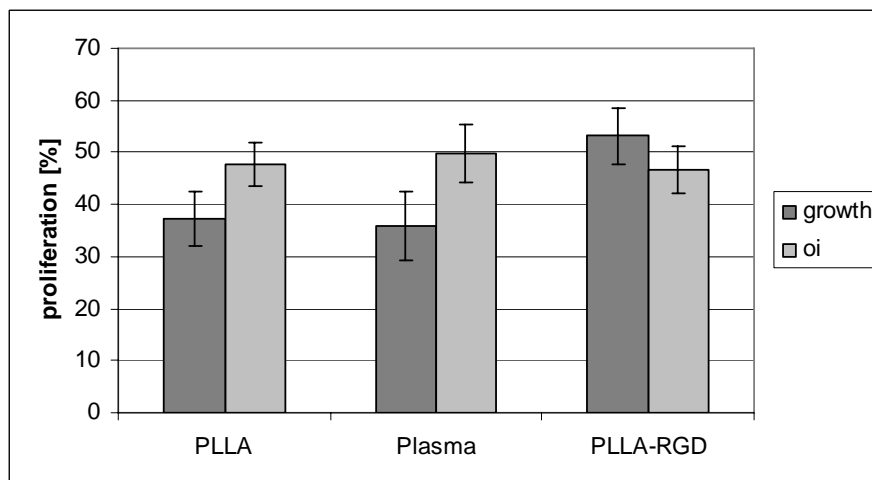
**Abbildungen 3.58:** A-B) A) PLLA-Fasern ohne Plasmabehandlung  
B) PLLA-Fasern mit 2 Minuten Plasmabehandlung

Zur Beschreibung der biologischen Effekte von mesenchymalen Stammzellen auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern wurden von unserem Kooperationspartner von der Orthopädie Marburg zuerst das Wachstum und die Proliferation auf diesen Fasermatrices unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ungefähr 12.500 Zellen pro Deckglas mit Fasern ausgesät. Das Wachstum wurde über eine Kultivierungszeit von 4 und 22 Tagen bestimmt. Wie die Abbildungen 3.59 und 3.60 zeigen, konnte keine Erhöhung der Zelldichte oder Proliferationsrate der

oberflächenfunktionalisierten Fasermatrices im Vergleich zu reinen PLLA-Fasern erreicht werden.



**Abbildung 3.59:** Kein Unterschied in der Zelldichte auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

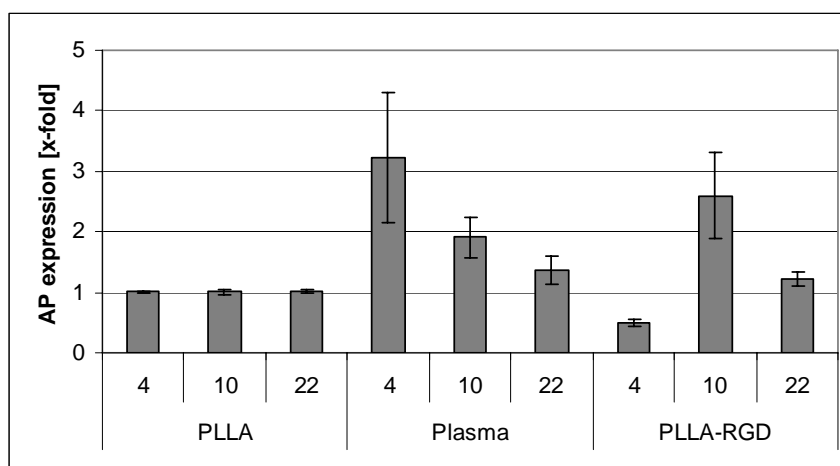


**Abbildung 3.60:** Kein Unterschied in der Proliferation auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Die Bildung von Osteoblasten auf den oberflächenfunktionalisierten Fasern kann durch die Expression von bestimmten Genen verfolgt werden. Dazu wird die entsprechende Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern durch die entsprechenden Expressionsniveaus im Zellwachstum bestimmt und verglichen. Wie schon beschrieben wurden die Zellen unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen kultiviert. Die Plasmabehandlung von PLLA-Fasern erhöht die Genexpression, was die Bildung von mehr Osteoblasten zeigt. Die zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

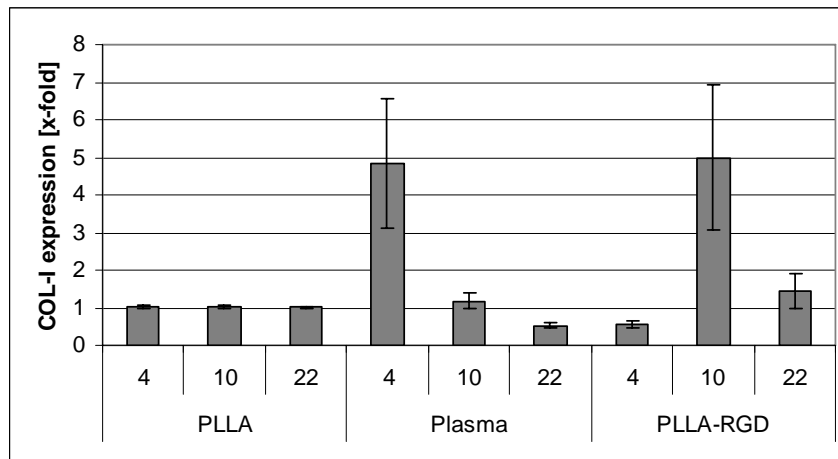
zeigen dagegen eine anfängliche Abnahme der Genexpression. Nach 10 Tagen Kultivierungszeit sind die Genexpressionsniveaus bei allen Fasertypen gleich. Im Falle des Osteokalzins ist die Expression signifikant höher, verglichen mit den PLLA-Fasern und plasmabehandelten PLLA-Fasern.

### Genexpression unter Wachstumsbedingungen:



**Abbildung 3.61:** Expression der Alkalischen Phosphatase auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Nach vier Tagen Kultivierungszeit nimmt die Expression der Alkalischen Phosphatase auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um den Faktor drei zu (Abbildung 3.61). Dagegen nimmt die Expression der Alkalischen Phosphatase auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um die Hälfte ab. Nach 10 Tagen Kultivierungszeit ist die höchste Expression der Alkalischen Phosphatase (etwa 2,5-fach) auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern zu beobachten. Nach 22 Tagen haben sich die Expressionsniveaus der Alkalischen Phosphatase auf allen drei Fasertypen einander angeglichen.

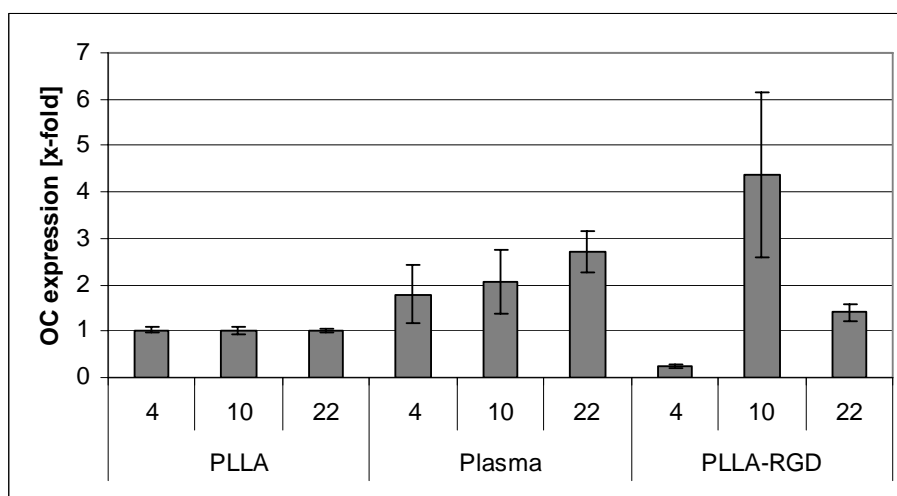


**Abbildung 3.62:** Expression von Kollagen (Typ I) auf PLLA-Fasern, auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Nach vier Tagen Kultivierungszeit nimmt die Expression des Kollagens (Typ I) auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um den Faktor fünf deutlich zu (Abbildung 3.62). Dagegen nimmt die Expression des Kollagens (Typ I) wie auch im Falle der Alkalischen Phosphatase auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um die Hälfte ab.

Nach 10 Tagen Kultivierungszeit nimmt die Expression des Kollagens (Typ I) auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um den Faktor fünf deutlich zu.

Nach 22 Tagen haben sich die Expressionsniveaus des Kollagens (Typ I) auf allen drei Fasertypen einander angeglichen.



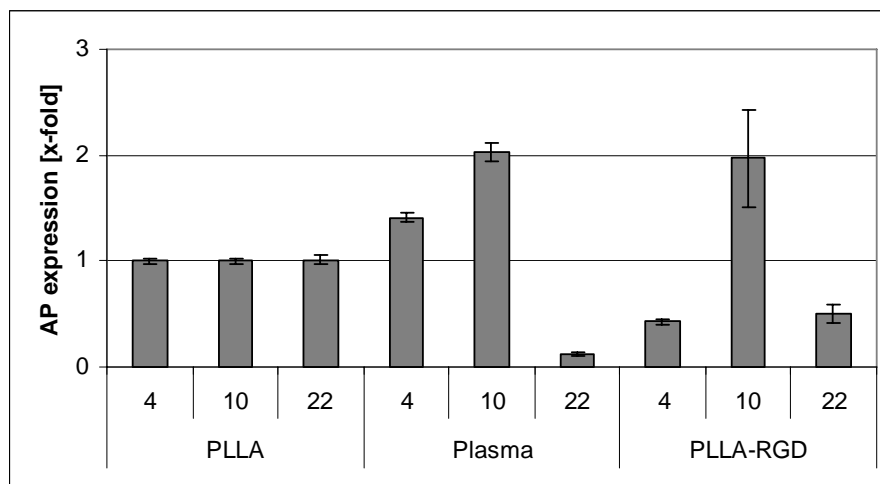
**Abbildung 3.63:** Expression von Osteokalzin auf PLLA-Fasern, auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Nach vier Tagen Kultivierungszeit nimmt die Expression des Osteokalzins auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern etwa um den Faktor zwei zu (Abbildung 3.63). Dagegen nimmt die Expression des Osteokalzins wie auch im Falle des Kollagens (Typ I) und der Alkalischen Phosphatase auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern deutlich ab.

Nach 10 Tagen Kultivierungszeit nimmt die Expression des Osteokalzins auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um den Faktor vier deutlich zu.

Nach 22 Tagen Kultivierungszeit ist das Expressionsniveau des Osteokalzins auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern mit einem Faktor von drei am Höchsten.

#### Genexpression unter Differenzierungsbedingungen:

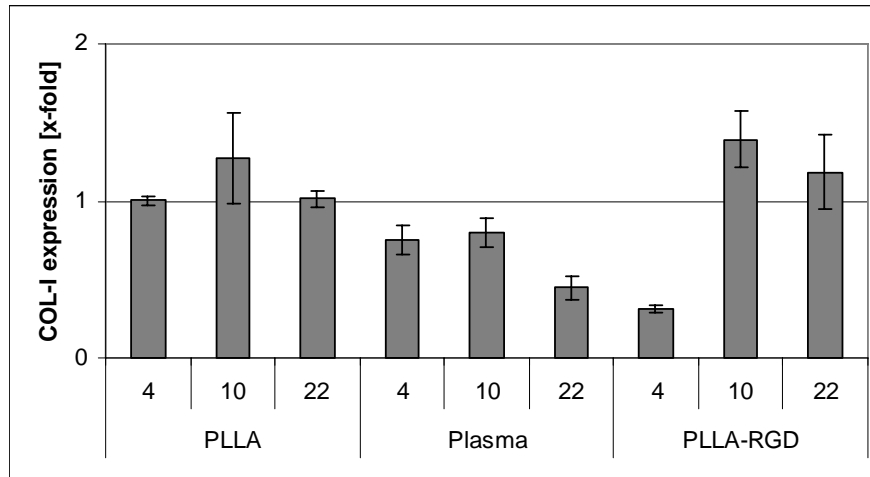


**Abbildung 3.64:** Expression der alkalischen Phosphatase auf PLLA-Fasern, auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Wie in der Abbildung 3.64 zu sehen nimmt die Expression der Alkalischen Phosphatase nach vier Tagen Kultivierungszeit auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern kaum zu. Dagegen nimmt die Expression der Alkalischen Phosphatase auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um die Hälfte ab.

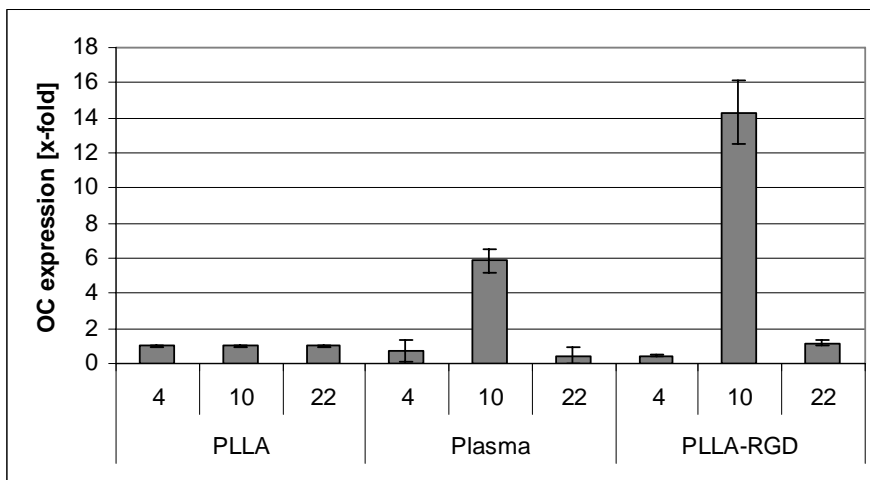
Nach 10 Tagen Kultivierungszeit ist die Expression der Alkalischen Phosphatase auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern und den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern auf dem gleichen Niveau (2-fach).

Dagegen geht die Expression der Alkalischen Phosphatase nach 22 Tagen bei beiden Fasertypen im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern zurück.



**Abbildung 3.65:** Expression von Kollagen (Typ I) auf PLLA-Fasern, auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

Nach vier Tagen ist die Expression von Kollagen (Typ I) auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich zu den unbehandelten PLLA-Fasern deutlich zurückgegangen. In den weiteren Kultivierungszeiten von 10 und 22 Tagen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Fasertypen (Abbildung 3.65).



**Abbildung 3.66:** Expression von Osteokalzin auf PLLA-Fasern, auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern

In der Abbildung 3.66 kann man feststellen, dass nach 10 Tagen Kultivierungszeit die Expression des Osteokalzins auf den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern um den Faktor 14 deutlich zunimmt. Zu gleichen Zeit nimmt die Expression des Osteokalzins auf plasmabehandelten PLLA-Fasern nur um Faktor sechs zu.

Humane mesenchymale Stammzellen wurden von unserem Kooperationspartner der Orthopädie Marburg auf glatten PLLA-Fasern ohne Sauerstoffplasmabehandlung, PLLA-Fasern mit zwei Minuten Sauerstoffplasmabehandlung und PLLA-Fasern mit den zyklischen RGD-Peptiden funktionalisiert kultiviert. Über eine Kultivierungszeit von 4 und 22 Tagen konnte keine Erhöhung der Zelldichte oder Proliferationsrate der oberflächenfunktionalisierten Fasermatrices im Vergleich zu reinen PLLA-Fasern erreicht werden. Nach 22 Tagen unter Wachstumsbedingungen hatten sich auch die Expressionsniveaus der Alkalischen Phosphatase und des Kollagens (Typ I) auf allen drei Fasertypen einander angeglichen. Nur das Expressionsniveau des Osteokalzins war auf den plasmabehandelten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern mit einem Faktor von drei am Höchsten. Über eine Kultivierungszeit von 10 Tagen unter Differenzierungsbedingungen konnte eine deutliche Erhöhung der Expression des Osteokalzins auf plasmabehandelten PLLA-Fasern und den zyklischRGD-funktionalisierten PLLA-Fasern im Vergleich mit reinen PLLA-Fasern festgestellt werden.

### 3.1.4 Zusammenfassung zu den *Bone Tissue Engineering* Arbeiten

Die Faseroberfläche von PLLA-Fasern konnte auf verschiedenen Wegen zur Verbesserung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen modifiziert werden. So konnten zunächst lineare und zyklische RGD-Peptide an der Faseroberfläche ohne Veränderung der Polymerstruktur angereichert werden. Dieses Anreichern der RGD-Peptide in ihrer bioaktiven Form konnte durch das Verspinnen einer PLLA/RGD-Peptid-Suspension und PLLA/RGD-Peptid-Emulsion realisiert werden. So vermitteln Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Emulsion das osteogene Potential von Kollagen. Dagegen vermitteln Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Suspension das osteogene Potential von Kollagen nur im geringen Ausmaß.

Weiterhin konnten zyklische RGD-Peptide an die Oberfläche von PLLA-Fasern erfolgreich angebunden werden. Dabei wurde die Plasmabehandlung von porösen PLLA-Fasern als untauglich eingestuft. Durch die Behandlung einer porösen PLLA-Faseroberfläche erhöht sich signifikant die Hydrophobie. Durch die Verwendung von glatten PLLA-Fasern konnte gezeigt werden, dass durch eine längere Sauerstoffplasmabehandlung dieser Fasern die Hydrophilie steigt. Durch Rasterkraftuntersuchungen an PLLA-Filmen konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffplasma die Rauigkeit der Oberfläche erhöht. Untersuchungen zu Zug-Dehnung von plasmabehandelten Fasern konnten zeigen, dass das Elastizitätsmodul durch Plasmabehandlung nicht verändert wird. Dagegen sinken die maximale Reißkraft und die maximale Dehnung von plasmabehandelten PLLA-Fasern mit der Sauerstoffplasmabehandlungszeit. Löslichkeitsstudien an PLLA-Fasern in MES-Puffer zeigten eine deutliche Zunahme der Hydrophilie durch die Plasmabehandlung an. Die Stabilität der Fasermatrix geht bei hohen Plasmabehandlungszeiten verloren.

Durch die erfolgreiche Anbindung des zyklischen RGD-Peptids durch die Verwendung von EDC/Sulfo-NHS nach einer Plasmabehandlung der PLLA-Fasern von zwei Minuten konnte ein osteoinduktiver Effekt für die Differenzierung erreicht werden. Es wird davon ausgegangen, dass das zyklische RGD-Peptid in seiner bioaktiven Form an die Faseroberfläche angebunden wurde.



## **3.2 Elektrogesponnene Fasermatrices für die Kultivierung von Pigmentepithel-Zellen**

### **3.2.1 Motivation und Zielsetzung**

Durch die Verwendung von Fasermatrices für die Kultivierung von Pigmentepithel-Zellen werden verbesserte Wachstums- und Diffusionseigenschaften im Vergleich zu Filmen angestrebt. Die durch das Elektrosponnen hergestellten Fasern sollen sich wegen ihrer Flexibilität optimal in den subretinalen Raum integrieren können. Die Fasern sollen weiterhin nicht auf einen Träger, wie Glas abgelegt werden, sondern eine „freihängende“ Fasermatte bilden. Das stellt eine besondere Herausforderung dar. Durch die bessere Einstellbarkeit der gewünschten Fasereigenschaften, wie Faserdurchmesser, -oberfläche, -morphologie und -deposition kann gezielt Einfluss auf das Zellwachstum genommen werden.

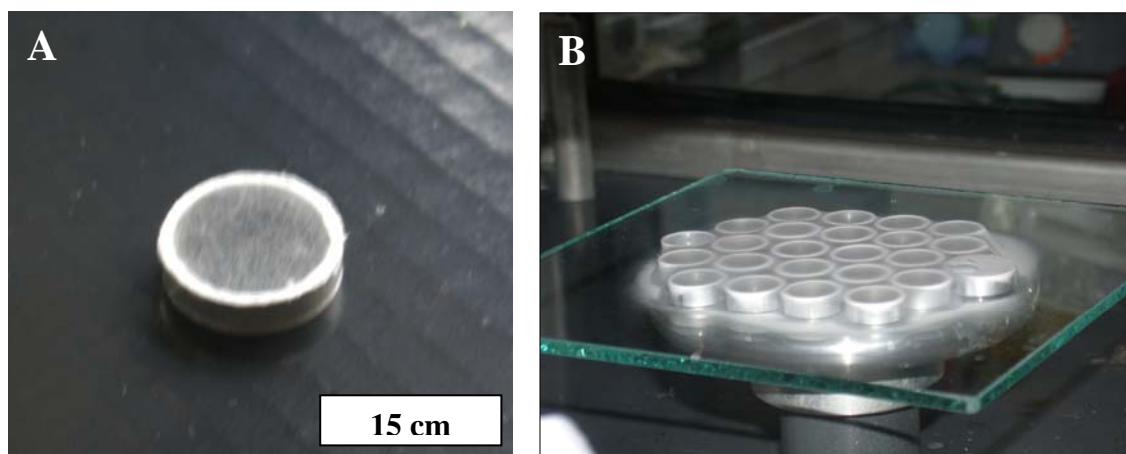
Die IPE Zellen sollen auf den „freihängenden“ Fasern bis zur Bildung eines konfluenten einschichtigen Zellverbandes im Brutschrank vorkultiviert und dann als komplettes Gewebe transplantiert werden. Die extrazelluläre Matrix soll über das Biomaterial „mitgebracht“ werden. Vorteil gegenüber einer Suspension ist, dass die Zellen ihre korrekte Polarität schon entwickeln können. Das ist wichtig für die Zellfunktion. Der Zellverband sollte leichter unter der Netzhaut positioniert werden können. Im Laufe der Zeit sollen sich die Fasern abbauen. Es ist dafür zu sorgen, dass die Zellen ihre eigene EZM bilden, um sich dauerhaft subretinal etablieren zu können. Als Ziel sollen die Fasern als Matrix von den Zellen „angenommen“ werden. Als Besonderheit sind hier Fasermatrices zu generieren, die „freitragend“ für die Zellversuche zum Einsatz kommen.

### **3.2.2 Systemwahl und Testung der Kompatibilität von Pigmentepithelzellen**

Für die ersten Zellversuche sollten Polyamid 6-Fasern auf Aluringen deponiert werden. Diese sollen später durch PLLA-Fasern ersetzt werden. Es soll zunächst die Aufgabe sein, „freitragende“ Fasern für die Zellversuche herzustellen.

### 3.2.2.1 Entwicklung einer freitragenden Polyamid(PA) 6-Matrix

Um „freitragende“ Fasermatrizes für die Zellversuche zu realisieren wurden Fasern auf Aluringe mit Ringaußendurchmessern von 15 cm und mit einer Wandstärke von 2 mm gesponnen (Abbildung 3.67 B). Bei den Spinnversuchen wurde ein Abstand von 15 cm von der Spinndüse bis zum Ring gewählt. Durch das Reinigen der Elektrospinnapparatur mit 70%igem Ethanol und die Einleitung von Pressluft durch einen sterilen Filter wurde eine relative Luftfeuchte unter 15 % erhalten. Es wurde keine Spannung am Ring angelegt sondern nur an der Spinndüse. Das zeigte sich sehr vorteilhaft für die Faserdeposition auf dem Aluminiumring.

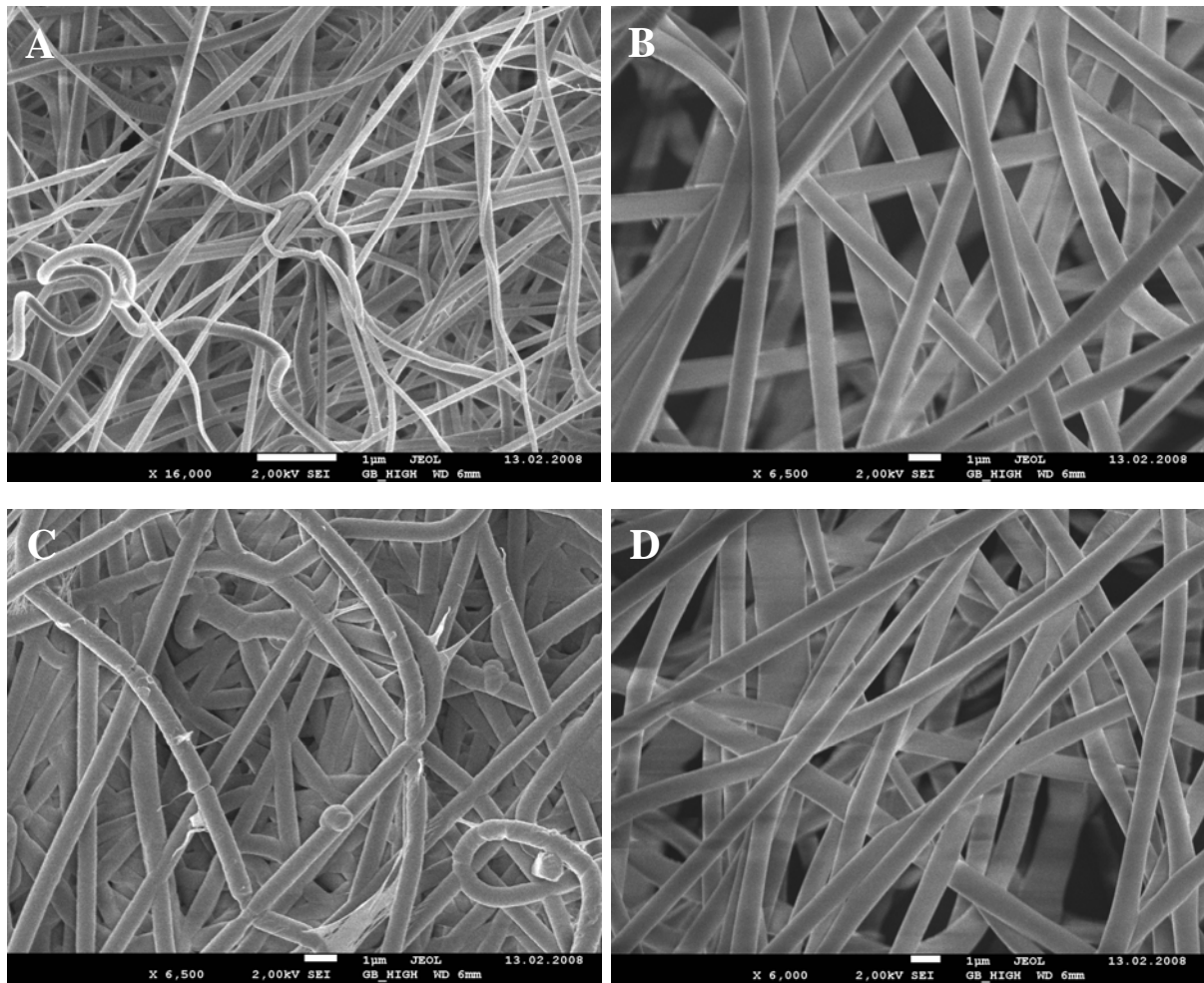


**Abbildungen 3.67:** A-B) A) „Freitragende“ PA 6-Fasern auf Aluminiumringen  
B) Gleichzeitiges Abscheiden von Fasern auf bis zu 25 Aluringen

### 3.2.2.2 Beschichtung mit Poly-*p*-Xylylen (PPX) einer freitragenden PA 6-Matrix

Zur Testung der Biokompatibilität wurden PA 6-Fasern mit Poly-*p*-Xylylen (PPX) beschichtet. Davor wurde das Polymer Polyamid 6 in Ameisensäure gelöst und zu Fasern versponnen. Die hergestellten Polymekonzentrationen lagen dabei bei 18 und 30 Gewichtsprozent. Die PA 6-Fasern und die PA 6 Fasern mit PPX-Beschichtung wurden bei den Zellversuchen getestet.

## 3.2.2.3 SEM-Charkterisierung der Fasermatrices



**Abbildungen 3.68:** A-D) A) PA 6 Fasern aus 18 wt % PA 6-Lösung (Mittlerer Faserdurchmesser 111 nm)

B) PA 6 Fasern aus 30 wt % PA 6-Lösung (Mittlerer Faserdurchmesser 767 nm)

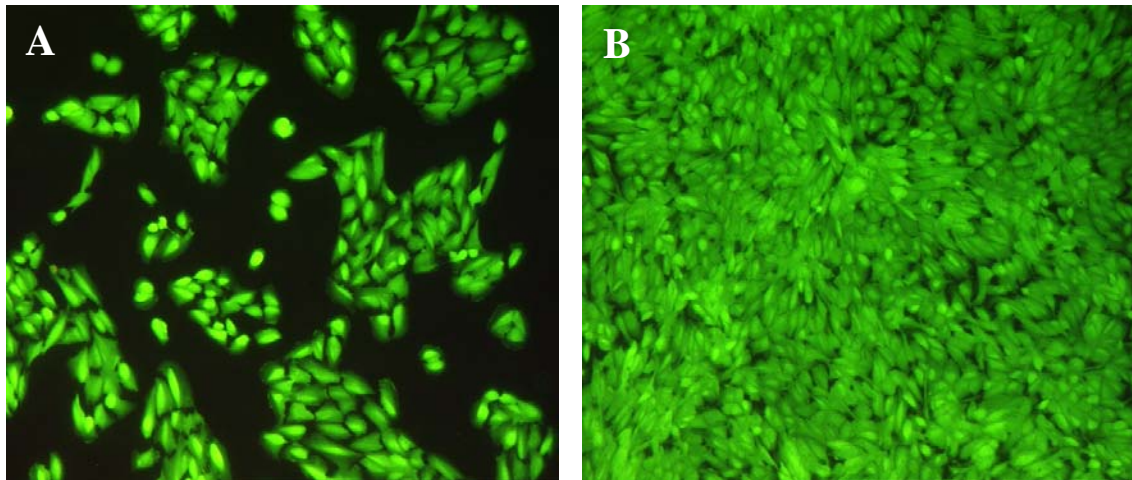
C) PA 6 Fasern aus 18 wt % PA 6-Lösung mit PPX (Mittlerer Faserdurchmesser 645 nm)

D) PA 6 Fasern aus 30 wt % PA 6-Lösung mit PPX (Mittlerer Faserdurchmesser 802 nm)

Alle Fasertypen haben eine glatte Oberfläche (Abbildungen 3.68 A-D). Unterschiede bestehen nur im mittleren Faserdurchmesser und in der chemischen Zusammensetzung der Faseroberfläche.

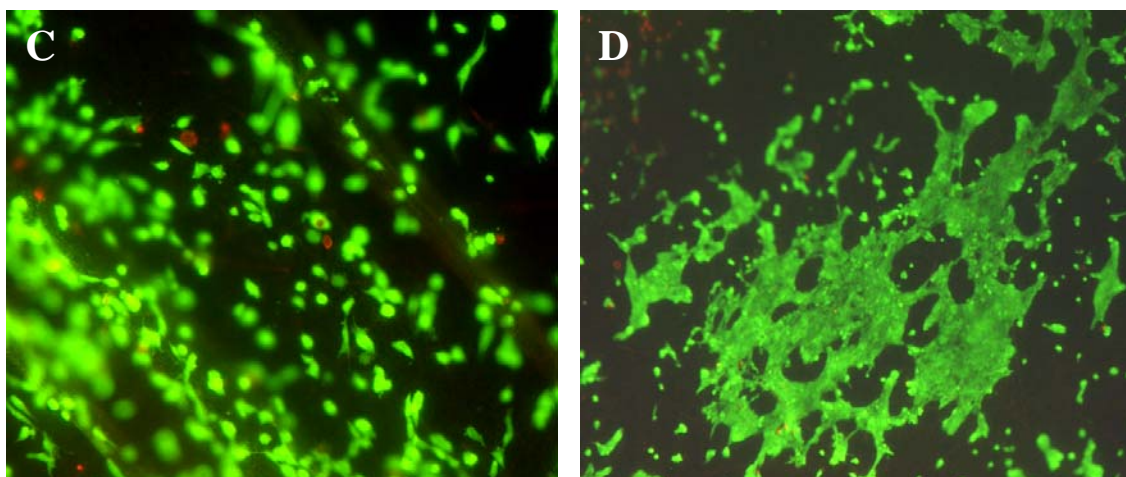
### 3.2.2.4 Ergebnisse der ersten Matrixbesiedlungsversuche mit Pigmentepithelzellen auf Polyamid-6-Fasern

Die folgenden Zellversuche wurden von unserem Kooperationspartner von der Augenklinik Aachen durchgeführt. Vor den Zellversuchen wurden die Fasern mit Wasserstoffperoxid bedampft. Es kann dabei zur Veränderung der Oberflächeneigenschaften kommen. Die Faseroberfläche kann eventuell aufrauen. Zum Einsatz kamen Retinale Pigmentepithelzellen einer humanen Zelllinie (ARPE-19). Es wurden bis zu drei Zellansätze durchgeführt. Die Abbildungen 3.69 A-B zeigen Humane Retinale Pigmentepithelzellen auf einer Glaskontrolle.



**Abbildungen 3.69:** A-B) Humane Retinale Pigmentepithelzellen auf einer Glaskontrolle

A) Vitalität nach 2 Tagen B) Vitalität nach 6 Tagen

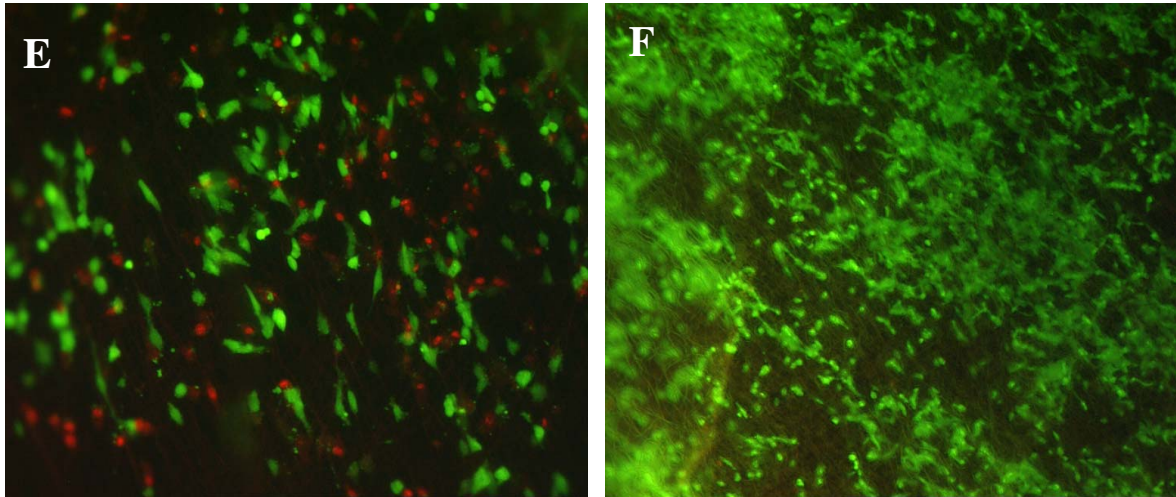


**Abbildungen 3.69:** C-D) Humane Retinale Pigmentepithelzellen auf Polyamid-6-Fasern (Faserdurchmesser:

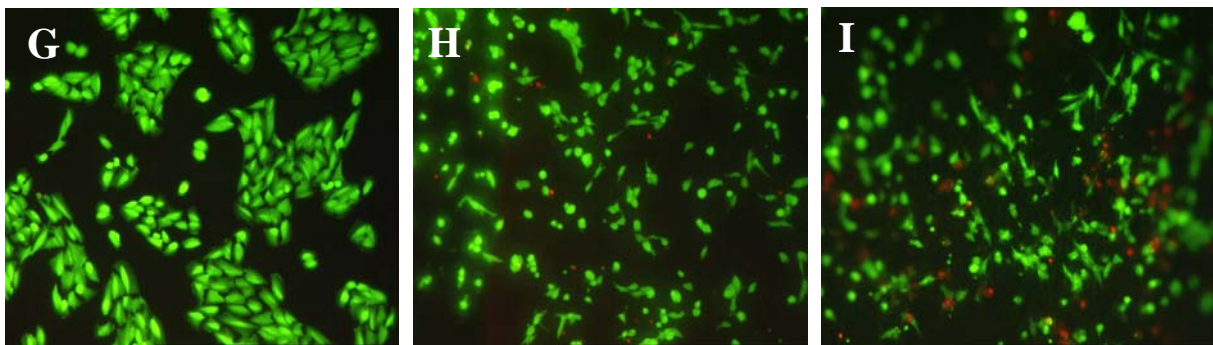
111 nm) C) Vitalität nach 2 Tagen D) Vitalität nach 6 Tagen



Die Vitalitätsfärbung wurde mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid durchgeführt. Dabei reagiert FDA nur mit der intakten Zellmembran (Enzyme) der vitalen Zellen und fluoresziert grün. Tote Zellen fluoreszieren rot. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid durch die nicht mehr funktionsfähige Zellmembran der toten Zellen und bindet an die DNA des Zellkerns. Die Abbildungen 3.69 C-D) und 3.69 E-F) zeigen die Vitalität der Humanen Retinalen Pigmentepithelzellen auf Polyamidfasern mit einem Faserdurchmesser von 111 und 767 nm.



**Abbildungen 3.69 E-F):** Humane Retinale Pigmentepithelzellen auf Polyamid-6-Fasern (Faserdurchmesser: 767 nm) E) Vitalität nach 2 Tagen F) Vitalität nach 6 Tagen



**Abbildungen 3.69: G-I):** Humane Retinale Pigmentepithelzellen zeigen gleiche Vitalität auf unterschiedlichen Polyamid-Faserstärken G) Glaskontrolle H) PA 6 Fasern mit PPX-Beschichtung 645 nm I) Fasern mit PPX-Beschichtung 802 nm

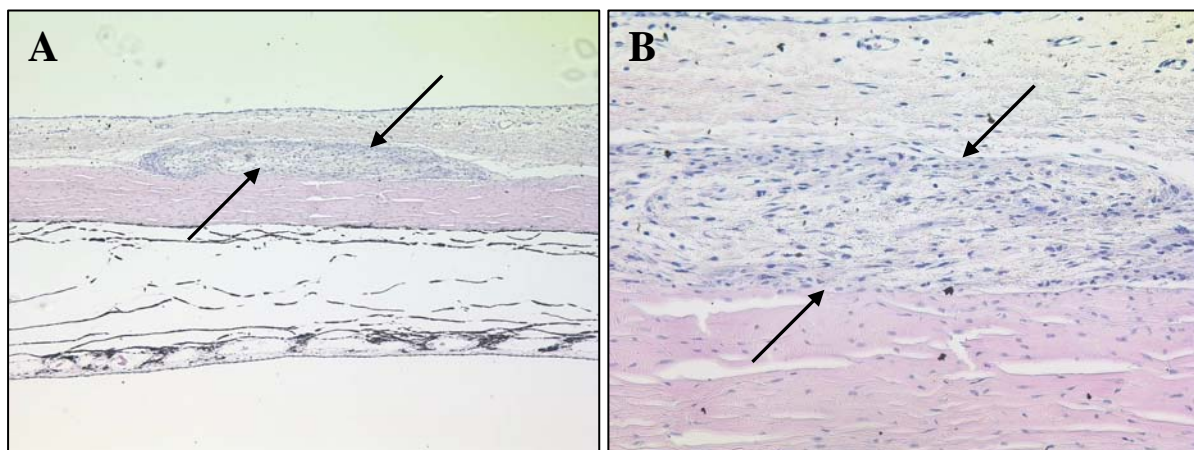
Die Abbildungen 3.69 G-I) zeigen Humane Retinale Pigmentepithelzellen auf einer Polyamid 6 Fasern mit einer PPX-Beschichtung. Es gibt keinen Unterschied in der Vitalität der Zellen.

Zusammenfassend zeigen die *in vitro* Zellversuche, dass die PA 6-Fasermatrices gute freitragende Eigenschaften in Kontakt mit Flüssigkeit haben. Auch die Zuschneidung der Fasermatrices auf die gewünschte Größe (2 x 2 mm) ist machbar.

Es wurde eine geringere „seeding-efficiency“ im Vergleich zu Kollagenfilmen erreicht. Es wurden initial viele tote Zellen beobachtet, die nicht adherieren konnten (Abbildung 3.69 E). Einige der Zellen wuchsen aus der Monolage in die dreidimensionale Struktur. Im Verlauf von sechs Tagen wurde in einigen Bereichen ein konfluentes Zellwachstum erreicht. Es wurde außerdem kein Unterschied im Zellwachstum zwischen den Polyamid 6-Fasern und den Polyamid 6-Fasern mit PPX-Beschichtung festgestellt. Dagegen zeigte sich ein besseres Zellwachstum auf PA 6-Fasern mit geringerem Faserdurchmesser (Abbildung 3.69 D).

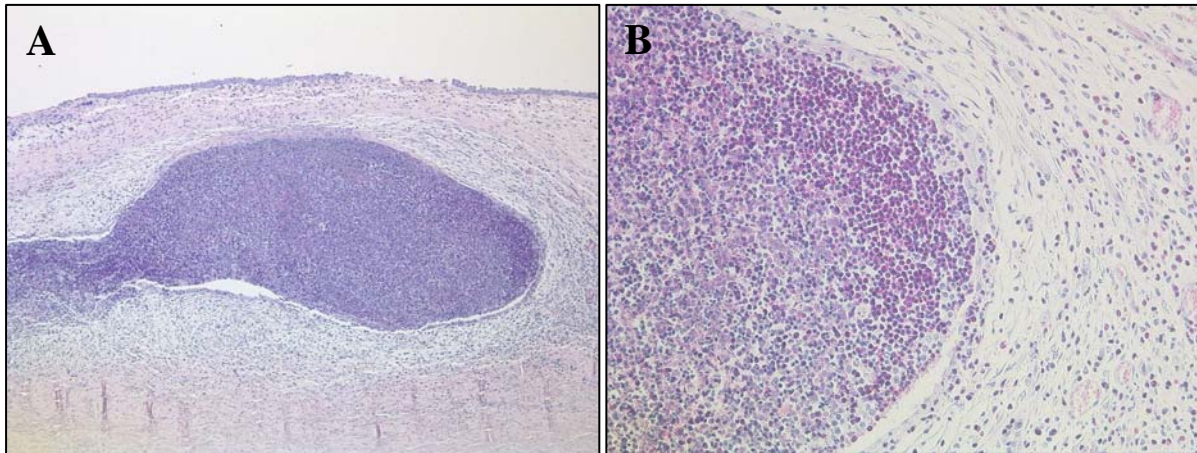
#### 3.2.2.5 Ergebnisse der ersten *in vivo* Fasertransplantationen unter die Bindehaut eines Kaninchens

Die ersten *in vivo* Transplantationen mit Polyamid 6-Fasern unter die Bindehaut des Kaninchens wurden von Prof. Dr. med. G. Thumann von der Augenklinik Aachen durchgeführt. Bei einigen Implantaten konnte eine deutliche Gefäßreaktion im Verlauf einer Woche festgestellt werden. Die Polyamid 6-Fasern zeigten jedoch sowohl klinisch als auch histologisch eine gute Verträglichkeit (Abbildungen 3.70 A-B). Die Polyamid 6-Fasern befinden sich innerhalb der Konjunktiva und beschreiben einen Oval (Durch Pfeile gekennzeichnet)



**Abbildungen 3.70:** A-B) Lichtmikroskopische Aufnahmen: Gute Verträglichkeit der Polyamidfasermatte (Mittlerer Faserdurchmesser 767 nm) A) 50 fach und B) 200 fach

Die Implantatstelle entzündete sich nur selten, wenn aber eine Entzündung auftrat, dann sehr stark. Es zeigte sich, dass im Falle einer Entzündung eher der Typ einer granulomatösen Entzündung vorlag und sich früh Granulationsgewebe ausbildete. Daher wird davon ausgegangen, dass die Entzündungsreaktion in diesen Fällen eher durch eine Transplantations-Komplikation, als durch das Material selbst hervorgerufen wurde. Somit scheinen die Polyamid 6-Fasern ein sehr gutes biokompatibles Material zu sein.



**Abbildungen 3.71:** A-B) Lichtmikroskopische Aufnahmen: Starke Entzündungen innerhalb der Polyamidfasermatte (Mittlerer Faserdurchmesser 767 nm) A) 50 fach und B) 200 fach

Die Abbildungen 3.71 A-B) zeigen eine floride eitrige Entzündung, die man anhand der vielen blauen Zellen (eosinophile und neutrophile Granulozyten) erkennt. Der entzündete Bereich erscheint abgekapselt und es finden sich neu gebildete Gefäße im Implantatbereich.

Bei der Durchführung der histologischen Untersuchungen wurde die Kaninchenbulbi in 3,7%-igem Formalin direkt nach der Entnahme für 72 Stunden fixiert. Anschließend wurde der Implantatstelle eine 1,5 x 1,5 mm Gewebeprobe entnommen, die die gesamte Dicke des Auges umfasst (Konjunktiva, Sklera, Retina). Diese wurde dann über Nacht entwässert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Nach dem Auskühlen wurden 2-4 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Nach der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Schnitte wurde die Eindeckung mit Hilfe eines xylohaltigen Mediums durchgeführt.

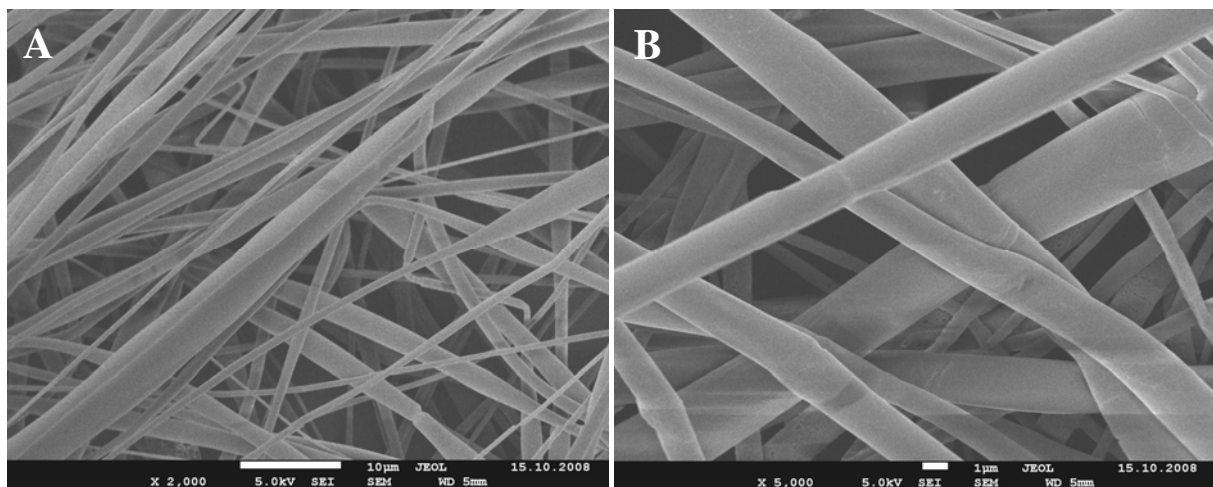


### 3.2.3 Entwicklung einer freitragenden Poly(L-lactid)matrix für die *in vitro* Zellkultivierung

Für die Entwicklung einer freitragenden Poly(L-lactid)matrix wurden die zuvor erhaltenen Erkenntnisse in der Generierung einer freitragenden Polyamid-6-Fasermatrix verwendet. Dazu wurden auf den Standardaluring mit einem Ringaußendurchmesser von 15 cm mit einer Wandstärke von 2 mm PLLA-Fasern abgeschieden. Es wurden glatte PLLA-Fasern bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 15 % erzeugt. Es wurden unterschiedliche Polymerkonzentrationen zu Fasern verarbeitet, um unterschiedliche Faserdurchmesser und Morphologien zu erhalten.

#### 3.2.3.1 Abhängigkeit der Fasermorphologie und des –durchmessers von der Polymerkonzentration

Aus den Zellversuchen mit Polyamid 6 –Fasern wurde ein verbessertes Wachstum auf Fasern mit geringerem mittleren Faserdurchmesser erhalten. In den Zellversuchen mit Poly(L-lactid)fasern sollten nur zwei unterschiedliche Faserstärken eingesetzt werden. Dazu werden aus einer 4 wt % PLLA-Lösung bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 15 % glatte PLLA-Fasern erhalten (Abbildungen 3.72 A-B). In den rasterelektronischen Untersuchungen wurde ein mittlerer Faserdurchmesser von 1,33  $\mu\text{m}$  bestimmt. Die einzelnen Faserdurchmesser liegen weit verteilt in einem Bereich von 280 nm bis 3,44  $\mu\text{m}$  vor.

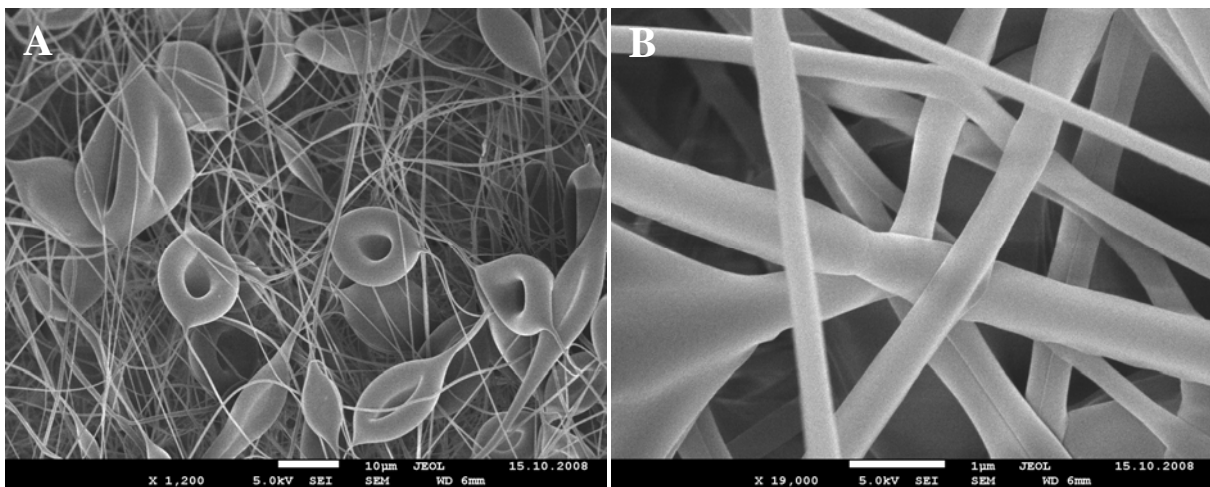


**Abbildungen 3.72:** A-B) Glatte PLLA-Fasern mit einem mittleren Faserdurchmesser von 1,33  $\mu\text{m}$



Eine geringere Faserstärke der PLLA-Fasern wurde aus einer 3 wt % PLLA-Lösung und einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 15 % erhalten. In den rasterelektronischen Untersuchungen wurde ein mittlerer Faserdurchmesser von 330 nm bestimmt. Die einzelnen Faserdurchmesser liegen in einem Bereich von 190 nm bis 920 nm vor.

Durch die Verwendung einer 3 wt % PLLA-Lösung beim Elektrospinnen konnten die PLLA-Fasern nicht verstreckt werden. Die Leitfähigkeit der PLLA-Lösung und das angelegte elektrische Feld sind zu niedrig eingestellt, um verdickungsfreie Fasern zu bekommen und es bilden sich Fasern mit Verdickungen (Abbildungen 3.73 A-B). Nach einer Absprache mit der Augenklinik Aachen wurden mit großem Interesse diese Fasern mit Verdickungen in den Zellversuchen eingesetzt.

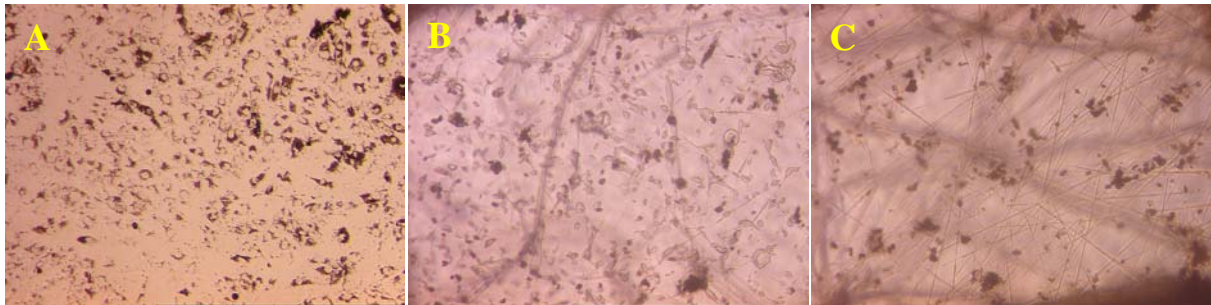


**Abbildungen 3.73:** A-B) Glatte PLLA-Fasern mit einem mittleren Faserdurchmesser von 334 nm

Man erhoffte sich eine größere „Auflagefläche“ für die Zellen. Durch die Verdickungen in den Fasern ist diese Fasermatte „filmähnlicher“ als ohne Verdickungen. Diese Fasermatrix kann als eine Zwischenstufe von einer Filmmatrix und einer reinen Fasermatrix angesehen werden. Aus den SEM-Bildern wurde die mittlere Verdickungslänge und –breite bestimmt. Die mittlere Verdickungslänge liegt bei 17,1 µm mit einer Verteilung zwischen 10,8 bis 26,6 µm. Die mittlere Verdickungsbreite liegt bei 9,3 µm mit einer Verteilung von 5,1 bis 14,4 µm.

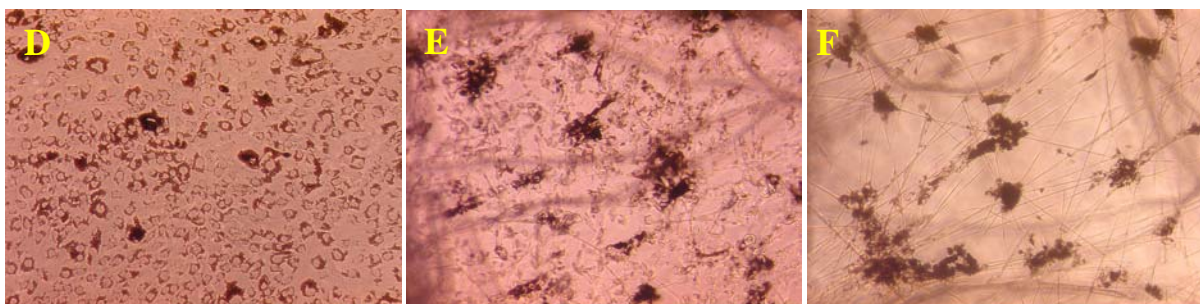
### 3.2.3.2 Matrixbesiedlungsversuche mit Bovinen Pigmentepithelzellen auf Poly(L-lactid)fasern

#### Zellversuche mit Bovinen Retinalen Epithelzellen (RPE)



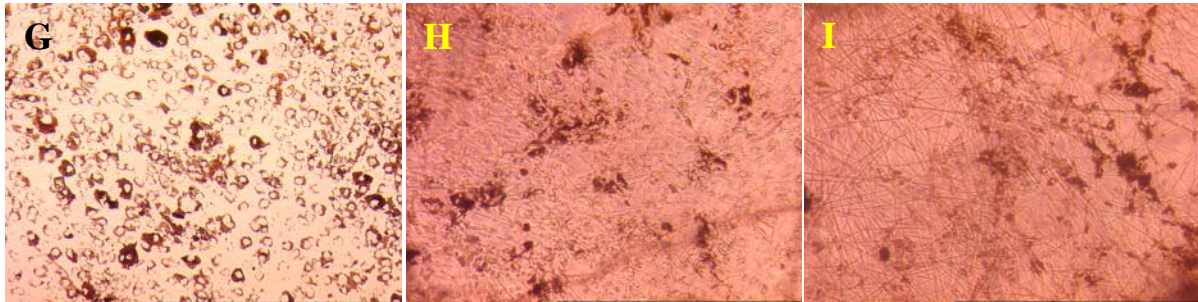
**Abbildungen 3.74:** A-C) Bovines RPE nach 4 Tagen auf A) Glaskontrolle B) PLLA-Fasern (330 nm)  
C) PLLA-Fasern (1,33 μm)

Die Durchlichtmikroskopie nach vier Tagen zeigt, dass viele Zellen durch das freitragende Faservlies „durchgefallen“ sind (Abbildungen 3.74 B/C). Viele Zellen schieden sich am Boden des Gefäßes ab. Im Vergleich zur Glaskontrolle (Abbildung 3.74 A) sind deutlich weniger Zellen auf den Fasern adhären. Auf den Fasern mit dem mittleren Faserdurchmesser von 1,33 μm (Abbildung 3.74 C) kann eine leicht höhere Zelldichte festgestellt werden als auf Fasern mit einem mittleren Faserdurchmesser von 330 nm (Abbildung 3.74 B). Die Form der Zellen ist noch kugelig, es kam deswegen noch nicht zur Ausbreitung des Zellkörpers.



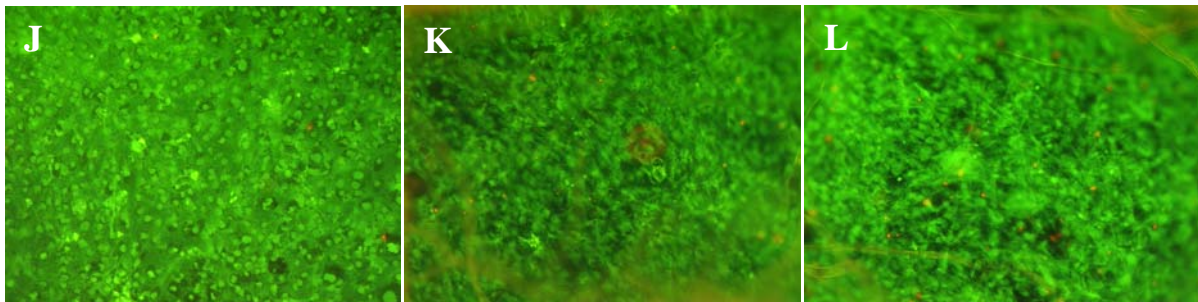
**Abbildungen 3.74:** D-F) Bovines RPE nach 7 Tagen auf D) Glaskontrolle E) PLLA-Fasern (334 nm)  
F) PLLA-Fasern (1,327 μm)

Nach sieben Tagen hat sich auf Glas ein konfluenter und geschlossener Zellrasen gebildet. Auf den PLLA-Fasern haben sich adhärenzte Zellen ausgebreitet und in Zellaggregaten angeordnet (Abbildung 3.74 E/F).



**Abbildungen 3.74:** G-I) Bovines RPE nach 11 Tagen auf G) Glaskontrolle H) PLLA-Fasern (334 nm)  
I) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

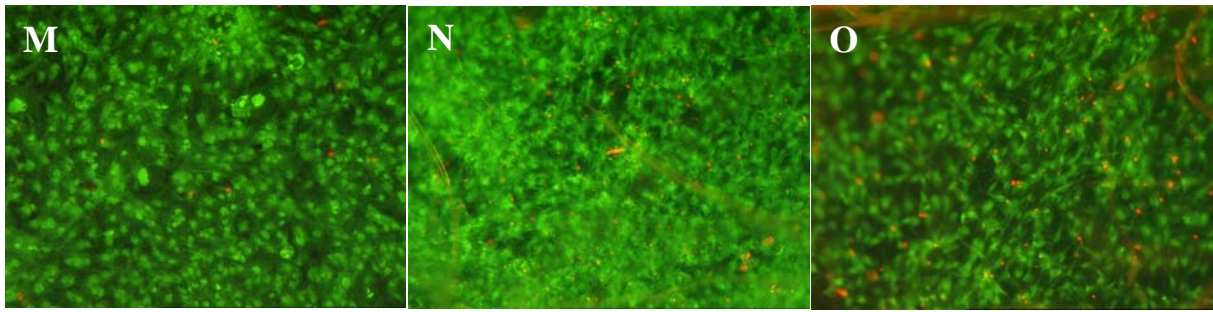
Nach 11 Tagen kann eine Zunahme der Zelldichte auf beiden Faserstärken beobachtet werden (Abbildung 3.74 H/I). Die Zell-Konfluenz auf dem Glas ist jedoch deutlich besser (Abbildung 3.74 G).



**Abbildungen 3.74:** J-L) Bovines RPE nach 14 Tagen auf J) Glaskontrolle K) PLLA-Fasern (334 nm)  
L) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

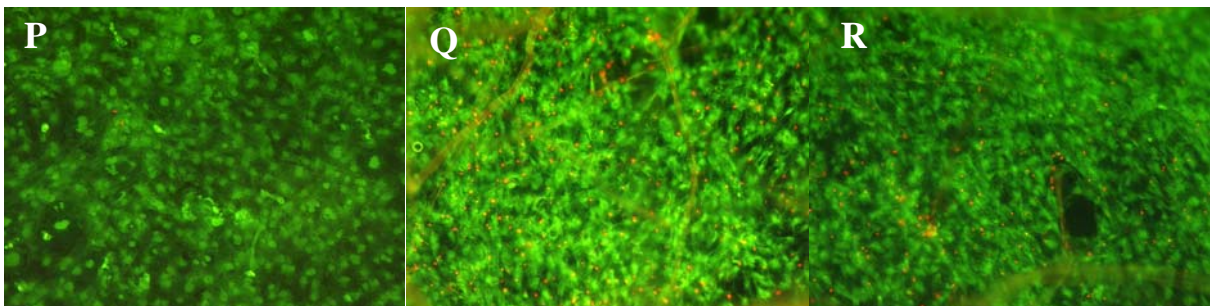
Nach 14 Tagen wurden erste Vitalitätstests durchgeführt. Auf dem Glas sind die Zellen hyperkonfluent und es sind nur ganz vereinzelt tote Zellen aufzufinden (Abbildung 3.74 J). Auf den Fasern sind deutlich mehr tote Zellen vorhanden. Dagegen ist das Zellwachstum annähernd konfluent (Abbildung 3.74 K/L).





**Abbildungen 3.74:** M-O) Bovines RPE nach 21 Tagen auf M) Glaskontrolle  
N) PLLA-Fasern (334 nm) O) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 21 Tagen sind einige tote Zellen auch auf der Glaskontrolle vorhanden (Abbildung 3.74 M). Es ist ein hyperkonfluenter Zellrasen vorhanden, da Zellen zum Teil übereinander wachsen. Auf Fasern sind deutlich mehr tote Zellen als nach 14 Tagen Zellwachstum aufgetreten (Abbildung 3.74 N/O). Insgesamt konnte ein subkonfluenter, überwiegend vitaler Zellrasen erhalten werden.

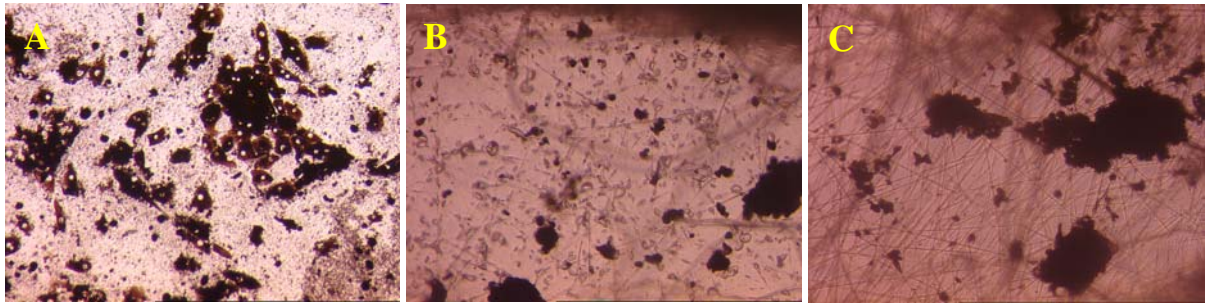


**Abbildungen 3.74:** P-R) Bovines RPE nach 28 Tagen auf P) Glaskontrolle Q) PLLA-Fasern (334 nm)  
R) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 28 Tagen ist keine deutliche Änderung festzustellen. Die Vitalitätsrate auf den „dünnere“ Fasern (Abbildung 3.74 Q) scheint etwas geringer zu sein als auf den „dickere“ Fasern (Abbildung 3.74 R).

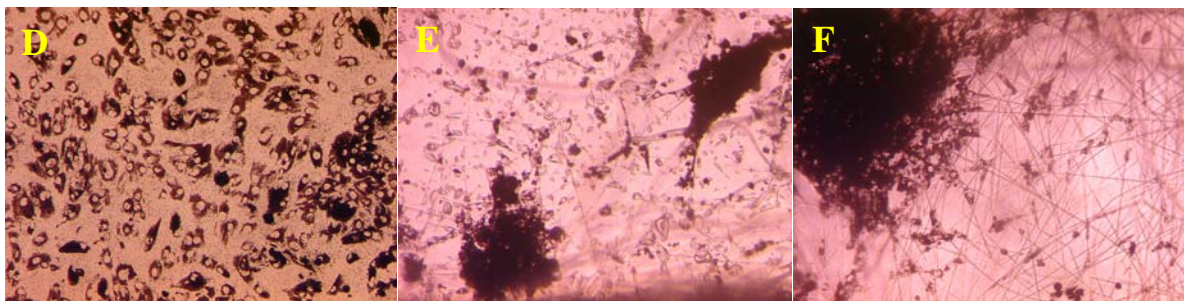
Insgesamt konnten keine signifikanten oder auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Fasertypen festgestellt werden.

### Zellversuche mit Bovinen Irispigmentepithelzellen (IPE)



**Abbildungen 3.75:** A-C) Bovines IPE nach 4 Tagen auf A) Glaskontrolle B) PLLA-Fasern (334 nm)  
C) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

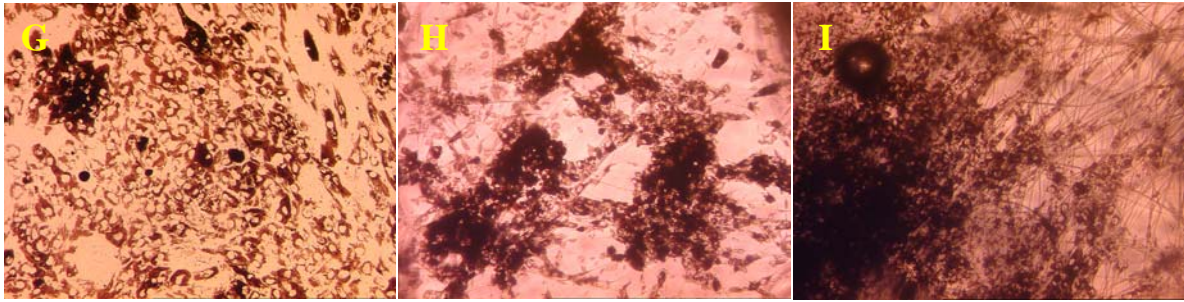
Nach vier Tagen sind Zellaggregate auf der Glaskontrolle und den Fasern zu beobachten (Abbildungen 3.75 A-C). Auf dem Glas sind die Zellen bereits ausgebreitet (Abbildung 3.75 A) dagegen sind die Zellen auf den Fasern noch kugelig (Abbildung 3.75 B/C).



**Abbildungen 3.75:** D-F) Bovines IPE nach 7 Tagen auf D) Glaskontrolle E) PLLA-Fasern (334 nm)  
F) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

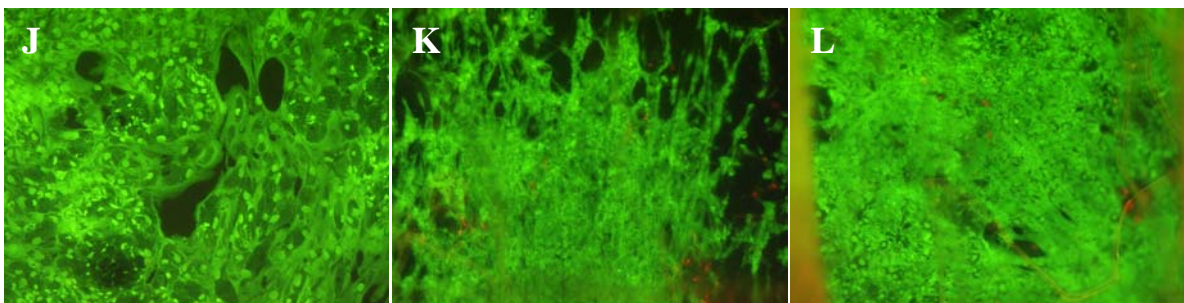
Nach sieben Tagen ist die Zelldichte auf dem Glas und den „dickeren“ Fasern deutlich angestiegen (Abbildungen 3.75 D-F). Auf den dünneren Fasern ist dagegen nur ein leichter Anstieg der Zelldichte zu beobachten (Abbildung 3.75 E). Die Zellen sind auf jeder Matrix ausgebreitet.





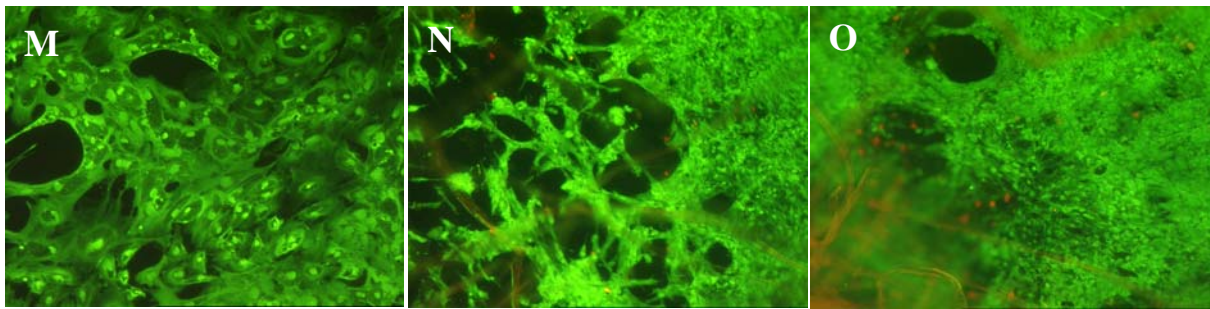
**Abbildungen 3.75:** G-I) Bovines IPE nach 11 Tagen auf G) Glaskontrolle H) PLLA-Fasern (334 nm)  
I) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 11 Tagen findet man auf Glas einen subkonfluenten Zellrasen mit kleinen Lücken vor (Abbildung 3.75 G). Auf den „dickeren“ Fasern ist eine weitere Zunahme an Zelldichte vorhanden (Abbildung 3.75 I). Außerdem liegen große Zellverbände vor, die aber nicht über das ganze Faservlies reichen. Bei den „dünneren“ Fasern ist die Zunahme der Zelldichte nicht so stark (Abbildung 3.75 H).



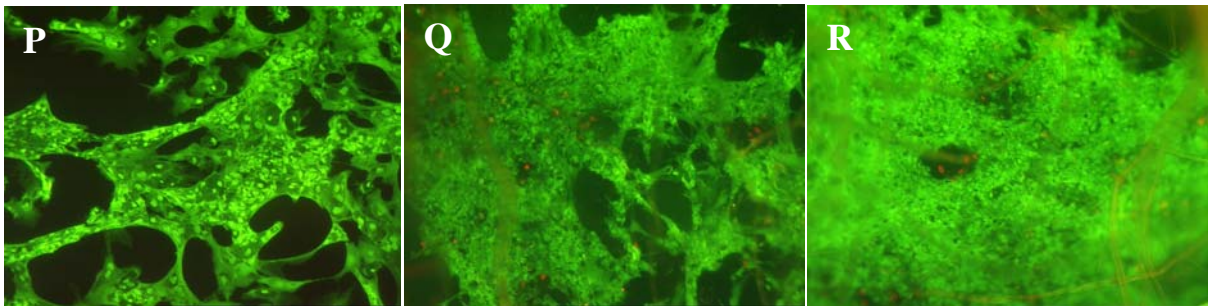
**Abbildungen 3.75:** J-L) Bovines IPE nach 14 Tagen auf J) Glaskontrolle K) PLLA-Fasern (334 nm)  
L) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 14 Tagen zeigt die Vitalitätsfärbung auf Glas 100 % vitale Zellen und einen subkonfluenten Rasen mit kleinen Lücken (Abbildung 3.75 J). Auf den Faservliesen mit den unterschiedlichen Faserdurchmessern sind einige tote Zellen zu beobachten. Die Vitalitätsrate von IPE liegt mit 90 % etwas höher als die Vitalitätsrate bei RPE zur gleichen Zeit. Das Faservlies mit den „dickeren Fasern“ ist zur Hälfte mit den Zellen dicht besiedelt (Abbildung 3.75 L). Auf den „dünneren“ Fasern liegt eine geringere Zelldichte vor (Abbildung 3.75 K).



**Abbildungen 3.75:** M-O) Bovines IPE nach 21 Tagen auf M) Glaskontrolle N) PLLA-Fasern (334 nm)  
O) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 21 Tagen kontrahieren sich die Zellen auf dem Glas, bleiben aber weiterhin vital (Abbildung 3.75 M). Es sind weniger tote Zellen von IPE auf Glas zu beobachten als zu der gleichen Zeit die RPE-Zellen auf Glas. Auf den PLLA-Fasern ist die gleiche Vitalität wie nach 14 Tagen zu beobachten (Abbildung 3.75 N/O). Es tritt aber das so genannte „Blebbing“ auf. Es handelt sich dabei um Membranabschnürungen, die noch grün leuchten. Insgesamt gibt es auf den Fasern deutlich weniger tote IPE-Zellen als RPE-Zellen zum gleichen Zeitpunkt.



**Abbildungen 3.75:** P-R) Bovines IPE nach 28 Tagen auf P) Glaskontrolle Q) PLLA-Fasern (334 nm)  
R) PLLA-Fasern (1,327  $\mu\text{m}$ )

Nach 28 Tagen gibt es keine wesentlichen Unterschiede zu beobachten. Es liegt die gleiche Vitalitätsrate auf beiden Fasertypen vor (Abbildung 3.75 Q/R). Es sind deutlich mehr tote Zellen auf Glas vorhanden (Abbildung 3.75 P).

### 3.2.4 Zusammenfassung zu den Kultivierungsversuchen mit Pigmentepithelzellen

Es konnten erfolgreich „freitragende“ Fasermatrizes aus Polyamid 6 und Poly(L-lactid) durch das Elektrosplennen auf Aluröhrchen mit definiertem Außendurchmesser generiert werden. Bei den ersten Untersuchungen mit PA 6 Faservliesen mit und ohne PPX-Beschichtung konnte gezeigt werden, dass diese Fasermatrizes gute freitragende Eigenschaften in Kontakt mit Flüssigkeit haben. Damit konnte das erste definierte Ziel erreicht werden. Auch die Zuschneidung der Fasermatrizes auf gewünschte Größe (2 x 2 mm) war machbar. Diese Fasermatrizes konnten anschließend von unserem Kooperationspartner von der Augenklinik Aachen erfolgreich für die *in vitro* Kultivierung von Pigmentepithelzellen etabliert werden. Vitalitätsfärbungen mit Fluoresceindiaceetat (FDA) und Ethidiumbromid zeigten eine hohe Vitalitätsrate auf Poly(L-lactid)fasern auf. Dagegen konnte eine geringere Vitalität der Zellen auf den PA 6 Faservliesen mit und ohne PPX-Beschichtung festgestellt werden. Bei den ersten *in vitro* Zellversuchen mit diesen Fasermatrizes wurde eine geringere Besiedlung mit Zellen im Vergleich zu Kollagenfilmen erreicht. Im Verlauf von sechs Tagen konnte jedoch in einigen Bereichen ein konfluentes Zellwachstum erzielt werden. Ein etwas besseres Zellwachstum konnte auf PA 6-Fasern mit geringerem Faserdurchmesser von 111 nm beobachtet werden. Bei den ersten *in vivo* Transplantationen mit Polyamid 6-Fasern unter die Bindehaut des Kaninchens konnte eine klinisch und auch histologisch gute Verträglichkeit ermittelt werden. Die prinzipielle Eignung von Fasern als Trägersystem für Pigmentepithelzellen wurde damit erbracht.

In den weiteren Zellversuchen wurden Poly(L-lactid)fasern mit zwei unterschiedlichen Faserstärken und Morphologien erfolgreich eingesetzt. Zu jedem Zeitpunkt konnte in den Versuchen eine höhere Zelldichte auf den Fasern mit einem mittleren Faserdurchmesser von 1,33 µm ohne Verdickungen festgestellt werden. Die Zelldichte auf Fasern mit einem mittleren Faserdurchmesser von 330 nm mit Verdickungen war entsprechend etwas geringer. Insgesamt war die Vitalitätsrate von Irispigmentepithelzellen etwas höher als bei Retinalen Pigmentepithelzellen. Es wurden weiterhin deutlich mehr tote Zellen auf der Glaskontrolle beobachtet, was stark für die Verwendung von Fasermatrizes als Matrix spricht. Insgesamt konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Konfluenz der Zellen auf der ganzen Fläche der Fasermatrizes beobachtet werden. Die *in vivo* Transplantationen mit Poly(L-lactid)fasern stehen noch aus.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Insbesondere in jüngerer Zeit konnten im Bereich der Gewebezüchtung - Tissue Engineering - signifikante Fortschritte erzielt werden. So ist es heute z.B. schon möglich Haut künstlich herzustellen und zu transplantieren. Deutliche Fortschritte sind auch im Bereich des Züchtens von Knochen, Muskeln und Knorpel erkennbar. Für die erforderliche Entwicklung einer idealen Matrix -*Scaffold*- für das Zellwachstum ist ein fundamentales Verständnis der Zell-Matrix-Wechselwirkungen unerlässlich. Für die Zellen muss ein *Scaffold* geschaffen werden, welches die natürliche extrazelluläre Matrix (EZM) nachahmt. Gerade Matrices aus Polymerfasern hergestellt über das Elektrospleinverfahren können diesem Anspruch gerecht werden. Da der biologische Aufbau der EZM in den Größenordnungen der hergestellten Polymerfasermatrices stattfindet, kann eine Imitation der natürlichen Strukturen vorgenommen werden.

Ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Oberflächenfunktionalisierung an Polymerfasermatrices gezielt Einfluss auf das Zellverhalten wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung zu nehmen. Das bestehende Poly(L-lactid) Scaffold-System wurde weiterentwickelt, indem spezifisch ausgesuchte Wirksubstanzen, wie lineare oder zyklische RGD-Peptide, an den Faseroberflächen angereichert wurden. Das Anreichern der RGD-Peptide in seiner bioaktiven Form konnte durch das Verspleinen einer PLLA/RGD-Peptid-Suspension und einer PLLA/RGD-Peptid-Emulsion realisiert werden. Weiterhin konnten zyklische RGD-Peptide an die glatte Oberfläche von PLLA-Fasern nach Aktivierung mit Sauerstoffplasma und Verwendung der EDC/Sulfo-NHS-Kopplungsstrategie erfolgreich angebunden werden. Der Einfluss von Sauerstoffplasma auf Struktur und Eigenschaften der PLLA-Oberflächen wurde durch Kontaktwinkelmessungen, Rasterkraftuntersuchungen, Zug-Dehungs-Experimente und Löslichkeitsstudien bestimmt.

In der Zusammenarbeit mit der AG Schofer der Universitätsklinikums Marburg wurde die Biokompatibilität dieser oberflächenfunktionalisierten Fasermatrices bezüglich humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) analysiert. So vermitteln Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Emulsion das osteogene Potential von Kollagen. Dagegen vermitteln Fasern aus einer Poly(L-lactid)/RGD-Suspension das osteogene Potential von Kollagen kaum. Bei der Kultivierung der RGD-funktionalisierten Polymerfasermatrix mit hMSC wurde ein osteoinduktiver Effekt festgestellt.

In einem weiteren Kooperationsprojekt mit der Augenklinik Aachen mit der Zielrichtung einer Behandlung der Altersbedingten Makula Degeneration (AMD) wurde eine „freitragende“ Fasermatrix aus Polyamid 6 und Poly(L-lactid) entwickelt. Diese Fasermatrizes konnten anschließend erfolgreich von unserem Kooperationspartner der Augenklinik Aachen für die *in vitro* Kultivierung von Pigmentepithelzellen etabliert werden. Die ersten *in vitro* Untersuchungen zu Vitalität und Wachstum dieser Zellen zeigten ein konfluentes Besiedeln und eine hohe Vitalität auf Polyamid 6-Fasermatrizes an. Bei den ersten *in vivo* Transplantationen mit den Polyamid 6-Fasern unter die Bindehaut des Kaninchens konnte eine klinisch und auch histologisch gute Verträglichkeit ermittelt werden. Bei weiteren Untersuchungen der Zellbiokompatibilität auf einer Poly(L-lactid)fasermatrix wurde eine höhere Vitalitätsrate der eingesetzten Irispigmentepithelzellen im Vergleich zu den Retinalen Pigmentepithelzellen erreicht. Insgesamt konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Konfluenz der Zellen auf der ganzen Fläche der Fasermatrizes beobachtet werden. Es ist daher erforderlich, die aus der Zusammenarbeit mit der Orthopädie Marburg, betreffend der Funktionalisierung der Fasermatrizes gewonnenen Erkenntnisse zu übertragen.

Die etablierte EDC/Sulfo-NHS-Kopplungsstrategie für die Anbindung von Wirksubstanzen kann weitergehend für die gezielte Einstellung von Oberflächeneigenschaften der Polymerfasern mittels z.B. hochselektiver Peptide, Proteine oder Katalysatoren verwendet werden. Z.B. im Bereich der Wundheilung bietet sich nun eine Kooperation mit der AG Vilcinskas vom Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie an. Für die isolierten antiseptischen Peptide aus Insekten kann ein Trägersystem aus Polymerfasern geschaffen werden.

Für die weitere Vorgehensweise gilt, dass die Konzentration der Wirksubstanz auf der Faseroberfläche bestimmt werden muss. Weiterhin sollte die Abhängigkeit des Zellwachstums von der Wirksubstanzkonzentration auf der Faseroberfläche untersucht werden. Auch die Konformation der ausgesuchten Wirkmoleküle sollte vor und nach dem Anbinden auf ihre „bioaktive“ Form untersucht werden. Schließlich wird auch eine exakte Untersuchung der Zell-Matrix-Wechselwirkungen notwendig sein. Es werden Fragen zu klären sein nach der Art der Intergrinrezeptoren auf der Zellmembran der jeweiligen verwendeten Zellen. Liegen diese in einer aktiven oder inaktiven Form vor? Wird eine Inaktivität durch bestimmte chemische Stoffe verursacht? Es muss das Ziel sein Wirksubstanzen in ihrer bioaktiven Form an die Faseroberfläche anzubinden und anschließend für die entsprechende „bioaktive“ Form der Zellintegrinrezeptoren zu sorgen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Polymere:

Pol(L-lactid) (PLLA), Resomer 210 (BOEHRINGER)

Polyamid 6, Ultramid B3 (BASF)

Lösungsmittel:

Dichlormethan, >99,8% (SIGMA-ALDRICH)

Ethanol,  $\geq 99\%$  (ROTH)

2-Propanol, >99,5% (SIGMA-ALDRICH)

Ameisensäure, 95 % (SIGMA-ALDRICH)

Reagenzien, Medien und Materialien:

Alexa Fluor 555 Hydrazid (Molecular Probes)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (Fluka)

*N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) (Fluka)

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Monohydrat (Fluka)

[2.2]Paracyclophan (SCS INT.)

Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes RGD (AnaSpec)

Lineares RGD (AnaSpec)

Cyclisches RGD (AnaSpec)

PBS-Culbecco, w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , LE, steril (BIOCHROM)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low Glucose (GIBCO)

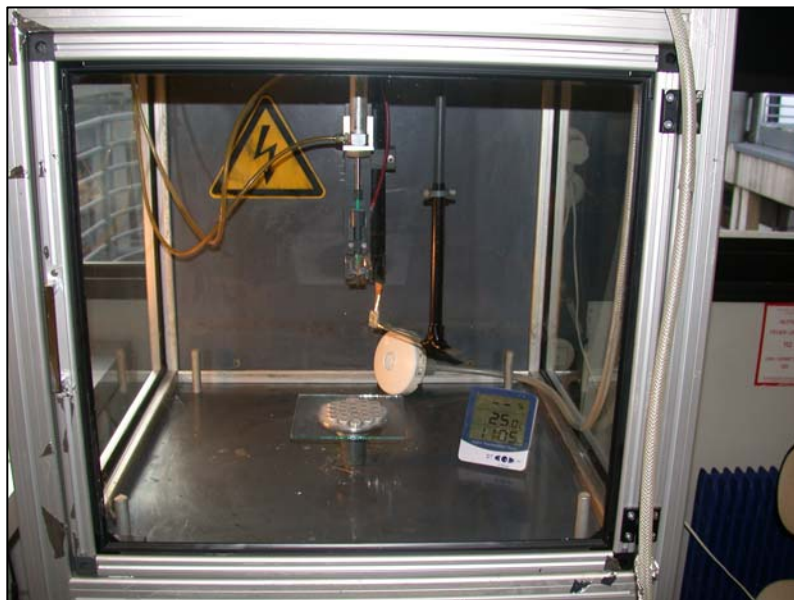
Parafilm® M (ROTH)

Silizium-Wafer (Dopand: Bor, Dicke: 0,7 mm) (SILTRONIC AG)

## 5.2 Präparation der Fasermatrices für das *Tissue Engineering*

### 5.2.1 Desinfektion der Elektrospinnanlage

Die Fasermatrices müssen für die Zellkulturen möglichst keimfrei hergestellt werden. Es muss vermieden werden, dass Bakterien, Viren und Pilzsporen vom Matrixmaterial in das Zellmedium gelangen. Außerdem sollte auch Staub nicht auf der Faseroberfläche gelangen, da dies die Oberflächeneigenschaften der Fasern verändert. Um eine Kontamination zu vermeiden wurde bereits von R. DERSCH in seiner Dissertation eine Elektrospinn-Apparatur aufgebaut, die fast luftdicht abgeklebt werden kann. Vor der Desinfektion der Elektrospinnanlage wurde die Apparatur im Inneren komplett abgeklebt und der Ventilator zum Abzug der Lösungsmittelreste ausgeschaltet. Gleichzeitig wurde durch die Trocknungsanlage Pressluft durch einen Partikelfilter in die Elektrospinn-Apparatur geleitet (Abbildung 5.1). Dadurch strömte keimarme Luft aus der Kammer und die Möglichkeit einer Kontamination konnte deutlich reduziert werden. Schon beim Desinfizieren der Anlage mit 70%igem Ethanol wurde gereinigte Luft eingeleitet. So konnte rasch eine keimarme Umgebung geschaffen werden.



**Abbildung 5.1:** Faserherstellung unter sauberen Bedingungen (Reinigung der inneren Spinnapparatur mit 70%igem Ethanol; Abdichtung und Einleitung von gefilterter Pressluft)

Um eventuell eingeschleppte Keime und Sporen zu entfernen wurden die gesponnenen Proben mittels Plasma sterilisiert. Zusätzlich wurde in das Zellmedium Antibiotika gegeben.

### **5.2.2 Elektrosinnen der Faserproben auf Glasplättchen**

Für die Zellversuche mit mesenchymalen Stammzellen wurden Fasern auf sterile runde Glasplättchen (Durchmesser = 16 mm) gesponnen. Diese wurden vorher gereinigt in Alufolie verpackt und anschließend autoklaviert. Sie wurden dann in die zuvor desinfizierte Elektrosinnenanlage eingeschleust und auf eine desinfizierte Glasplatte (12 × 12 × 0,5 cm) ausgelegt. Der Elektrodenabstand wurde in den Versuchen auf 15 cm eingestellt. In modifizierten Versuchen wurde ein sich drehender Untergrund verwendet. So konnten gleichzeitig bis zu 20 Glasplättchen gleichmäßig besponnen werden. Die Glasplättchen wurden steril verpackt und im BMFZ in der sterilen Werkbank weiterverarbeitet. Dazu wurden die Fasern auf den Glasplättchen mit einer 4 Gewichtsprozent Poly(L-lactid)-Lösung am ganzen Glasrand festgeklebt. In die Mitte des Glasplättchens wurde ein Klebepunkt gesetzt, um die ganze Fasermatte fest am Glasplättchen anzukleben. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde auf dazugelegte Siliziumträger gesponnen.

### **5.2.3 Elektrosinnen der Faserproben auf Aluringe**

Um „freitragende“ Fasern für die Zellversuche zu realisieren wurden Aluringe in unterschiedlichen Ringaußendurchmessern (10 bis 28 mm) hergestellt. Außerdem wurden auch die Wandstärken variiert. Die Aluringe wurden nacheinander auf eine Glasplatte gelegt und die Abhängigkeit der Faserdeposition vom Ringdurchmesser getestet. Die gezielte Abscheidung auf den Aluringen gestaltete sich anfangs schwierig, da sich die Fasern durch den Ring auf der Glasplatte abgeschieden haben. Deswegen konnte Fasern nur auf Aluringe mit einem Ringdurchmesser von 20 mm oder kleiner und mit einer Wandstärke von 2 mm abgelegt werden. Als Standard wurde ein Ringaußendurchmesser von 15 mm mit einer Wandstärke von 2 mm eingeführt. Kleiner konnte der Ringdurchmesser nicht sein, da die Spannvorrichtung für die Zellversuche in Aachen nur bis zu dieser Größe möglich war. Bei den Spinnversuchen wurde ein Abstand von 15 cm von der Spinn Düse bis zum Ring gewählt. Durch die Einleitung der gefilterten Luft wurde eine relative Luftfeuchte unter 15 % erhalten. Es wurde keine Spannung am Ring angelegt sondern nur an der Spinn Düse. Das erwies sich als sehr vorteilhaft für die Faserdeposition auf dem Aluminiumring.

### **5.2.4 Elektrosinnen der Faserproben auf eine rotierende Scheibe**

Für die Generierung von orientierten Fasermatten für die Zug-Dehungs-Versuche wurde auf eine rotierende Scheibe mit einem Scheibenumfang von 60 cm und einer Scheibenbreite von 1 cm gesponnen. Es wurde eine Rotation von 1000 Umdrehungen pro Minute eingestellt. Es wurde eine Spannung von 24 kV verwendet. Der Elektrodenabstand zwischen der Spinndüse und der Scheibe wurde auf 12 cm eingestellt. Weiterhin wurde eine Flussrate von 0,3 mL pro Stunde gewählt. Außerdem wurde die relative Luftfeuchtigkeit durch das Einleiten von trockenen Pressluft in die Spinnkammer unter 15 % gehalten um glatte PLLA-Fasern zu erhalten.

### **5.2.5 Elektrosinnen der verschiedenen Polymere**

#### **Versinnen von Poly(L-lactid)**

Für die Experimente wurde das Poly(L-lactid) Resomer L 210 von Boehringer verwendet. Dazu wurden unterschiedliche Polymerkonzentrationen von 2 bis 4 Gewichtsprozent in Dichlormethan hergestellt. Für den Spinnversuch wurde die PLLA-Lösung ohne Kanüle aufgezogen und erst dann mit einer Kanüle verschlossen. Anschließend wurden eingeschlossene Luftblasen durch Anstoßen mit dem Finger gegen die Kunststoffspritze und Ausdrücken von etwas PLLA-Lösung entfernt. Als Spinndüse wurden immer Kanülen von 0,45 Millimeter verwendet. Dazu wurden die Spitzen der Kanülen mit einer Zange entfernt. Der Elektrodenabstand wurde immer, mit wenigen Ausnahmen, auf 15 cm eingestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde je nach Bedarf auf 50 % oder weit unter 15 % eingestellt. Für die Bildung von glatten PLLA-Fasern ohne Poren sollte die relative Luftfeuchtigkeit unter 15 % liegen. Durch die Verwendung eines Abstreifers der Spinndüse wurde die angetrocknete PLLA-Lösung am Spinndüsenende je nach Einstellung des Abstreifintervalls entfernt. Der Spinnprozess wurde dabei nicht beeinträchtigt. Auch die Umgebungstemperatur wurde so gut wie möglich konstant gehalten. Diese lag im Schnitt bei 22 °C. Auch die Flussrate wurde durchgehend gleich gehalten. Diese lag bei 0,3 mL pro Stunde. Die Hochspannung wurde auf 25 Kilovolt eingestellt.

## Verspinnen von Polyamid 6

Für die Zellexperimente in Aachen wurden zunächst Polyamid 6-Fasern hergestellt. Dazu wurde das Ultramid B3 von BASF verwendet. Gelöst wurde das Polymer in Ameisensäure. Die hergestellten Polymekonzentrationen lagen dabei bei 18 und 30 Gewichtsprozent. Beim Aufziehen der Lösung wurde wie beim Verspinnen der Poly(L-lactid)-Lösung vorgegangen. Als Spinnndüse wurden immer Kanülen von 0,45 Millimeter verwendet. Der Elektrodenabstand wurde immer auf 15 cm eingestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde zwischen 17 und 26 % gehalten. Die Flussrate lag bei allen Spinnversuchen bei 0,075 mL pro Stunde. Die Hochspannung wurde auf 25 kV eingestellt

### 5.2.6 PPX-Beschichtung durch Chemische Gasphasenabscheidung

Für die Poly-*p*-Xylylen (PPX)-Beschichtung der Polyamid 6-Fasern wurde der Beschichter Labcoater 1 PDS 2010 der Firma SPECIALTY COATING SYSTEMS zur chemischen Gasphasenabscheidung (CVD, *chemical vapor deposition*) verwendet. Die Fasern wurden zuvor auf Aluminiumringen festgeklebt und diese dann am Boden der Beschichtungsapparatur mit den Fasern nach oben gestellt. Mit einer [2.2]Paracyclophan-Einwaage von 372 mg wurde eine 200 nm dicke PPX-Beschichtung erzeugt. Die Schichtdicken wurden anschließend bestimmt, indem die Faserdurchmesser der unbeschichteten und beschichteten Faserproben im Elektronenmikroskop untersucht und miteinander verglichen hatte.

## **5.3 Anreicherung von RGD-Peptiden an der Faseroberfläche**

### **5.3.1 Verspinnen von PLLA-RGD-Emulsionen**

Zunächst wurde eine 4,44 wt.% PLLA-Lösung hergestellt. Dazu wurden 1,11 g PLLA-Granulat in 23,95 g Dichlormethan bei Raumtemperatur gelöst. Gleichzeitig wurde eine 1,0 mg/mL cyclische RGD-Lösung (dd H<sub>2</sub>O) hergestellt, indem 1 mg des cyclischen RGD-Peptids in einem Milliliter doppelt destilliertem Wasser gelöst wurde.

Es wurde 0,9 ml der 4,44 wt. % PLLA-Lösung mit 100 µL der 0,1 mg/mL cyclischen RGD-Lösung (dd H<sub>2</sub>O) versetzt. Durch das Verrühren der flüssigen PLLA-Lösung und der flüssigen cyclischen RGD-Lösung im Vortex Mixer für 5 Minuten wurde eine Emulsion hergestellt. Diese Emulsion wurde zu Fasern versponnen.

Die PLLA-RGD-Emulsion wurde in eine 1 ml Spritze aufgenommen und durch eine Kanüle (0,45 mm Durchmesser) gedrückt und einem elektrischen Feld von 20 kV ausgesetzt. Der Abstand zwischen der Kanüle und der Gegenelektrode lag bei 15 cm. Die Flussrate wurde bei 0,12 ml pro Stunde gehalten. Die PLLA-Fasern wurden auf Glasplättchen gesponnen.

### **5.3.2 Verspinnen von PLLA-RGD-Suspensionen**

Zunächst wurde eine 4 wt.% PLLA-Lösung hergestellt. Dazu wurden 2 g PLLA-Granulat in 48 g Dichlormethan bei Raumtemperatur gelöst. Zunächst wurden PLLA-Fasern durch das Elektrosponnen hergestellt. Dazu wurde die PLLA-Lösung in eine 1 ml Spritze aufgenommen und durch eine Kanüle (0,45 mm Durchmesser) gedrückt und einem elektrischen Feld von 17 kV ausgesetzt. Der Abstand zwischen der Kanüle und der Gegenelektrode lag bei 15 cm. Die Flussrate wurde bei 0,11 ml pro Stunde gehalten. Die PLLA-Fasern wurden auf Glasplättchen gesponnen. Es wurde 1 ml der PLLA-Lösung mit 1 mg der cyclischen RGD-Sequenzen versetzt. Danach wurde diese Lösung für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Diese Suspension wurde zu Fasern versponnen. Die Parameter zum Elektrosponnen wurden gleich gehalten. Weiterhin wurde aus 1 ml der PLLA-Lösung und 1 mg der linearen RGD-Sequenzen eine Suspension hergestellt und zu Fasern versponnen. Die Parameter zum Elektrosponnen wurden hierbei ebenfalls gleich gehalten.



Zu den Verteilungsuntersuchungen der RGD-Sequenzen in den PLLA-Fasern wurde das lineare Fluoresceinisocyanat(FITC)-RGD verwendet und jeweils eine Suspension und Emulsion hergestellt. Zur Herstellung der FITC-RGD/PLLA-Suspension wurde 1 mg FITC-RGD in 1 ml PLLA-Lösung verrührt. Diese Suspension wurde anschließend zu Fasern versponnen. Die Spinnparameter wurden gleich gehalten. Zur Herstellung der FITC-RGD/PLLA-Emulsion wurden 100 µL einer 0,1 mg/mL FITC-Lösung (PBS-Puffer) und 0,9 mL einer 4 wt. % PLLA-Lösung verrührt. Diese Emulsion wurde anschließend zu Fasern versponnen. Die Spinnparameter wurden auch hier gleich gehalten.

## **5.4 Immobilisierung von Biomolekülen an der Faseroberfläche**

### **5.4.1 Immobilisierung von Alexa 555 Hydrazid**

Im ersten Schritt wurden Fasern durch das Verspinnen einer 4 wt% PLLA-Lösung hergestellt. Abgeschieden wurden die Fasern auf runde Glasplättchen. Im zweiten Schritt wurden die PLLA-Fasern zwei Minuten einer Sauerstoffbehandlung unterzogen, um die Oberfläche zu aktivieren. Im nächsten Schritt wurde die aktivierten Fasern für 30 Minuten in eine 12er Wellplate eingelegt und mit 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) bedeckt.

Zur Herstellung des ersten Teils des Kopplungsreagenzes wurden 66,6 mg EDC in 20 ml 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) gelöst. Die EDC-Konzentration liegt dabei bei 17,38 mmol. Für den zweiten Teil des Kopplungsreagenzes werden 37,7 mg Sulfo-NHS in 20 ml 0,1 M MES-Puffer gelöst. Die Sulfo-NHS-Konzentration liegt dabei bei 8,69 mmol. Zur Aktivierung der Carboxylgruppen an der PLLA-Oberfläche wurden jeweils 10 ml der EDC- und Sulfo-NHS-Lösung vereinigt. Es resultiert ein molares Verhältnis von EDC zu Sulfo-NHS von 2 zu 1. Es wird eine Lösung von 8,69 mmol EDC und 4,345 mmol Sulfo-NHS erhalten. Vor der Kopplungsreagenzzugabe wird der MES-Puffer entfernt. Der Aktivierungsschritt dauert 30 Minuten und wird bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wird das Kopplungsreagenz entfernt und 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) zugegeben (4 °C). Es folgt 10 Minuten „waschen“, um überschüssiges Kopplungsreagenz zu entfernen.

Das Alexa Fluor Hydrazid 555 ( $M_r = 1150$  g/mol) wird in 10 ml 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) gelöst, um eine Konzentration von 0,1 mg/ml (86,9 µmol;  $8,69 \cdot 10^{-5}$  mol/L) zu erhalten

(pH = 5,3). Vor der Zugabe wird die „Waschlösung“ entfernt und die Alexa-Lösung zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 2 Stunden und wird bei 4 °C durchgeführt. Danach wird die Alexa-Lösung entfernt und die Fasern 2-mal 10 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Fasern in Fluoromount-Lösung eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

#### **5.4.2 Immobilisierung von FITC-RGD**

Für die Immobilisierung von Fasern mit FITC-RGD werden zunächst glatte PLLA-Fasern auf runden sterilen Glasplättchen gesponnen. Danach werden die Fasern mit Plasma behandelt, um Carboxylgruppen zu generieren. Die plasmaaktivierten PLLA-Fasern werden in 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) für 30 Minuten gewaschen (12 Wellplate). Danach muss der MES-Puffer entfernt werden, um die aktivierten PLLA-Fasern in 8,69 mM EDC und 4,35 mM Sulfo-NHS (0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3)) für 90 Minuten zu inkubieren. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln durchgeführt. Zu Immobilisierung werden die PLLA-Fasern in einer 0,1 mg/mL FITC-RGD-Lösung (pH = 7,4) für 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 6 Stunden wird die Peptidlösung abpipettiert und das durch die physikalischen Wechselwirkungen schwach angebundene FITC-RGD durch Waschen mit PBS entfernt.

#### **5.4.3 Immobilisierung von zyklischen RGD-Peptiden**

Für die Funktionalisierung von Fasern werden zunächst glatte PLLA-Fasern auf runden sterilen Glasplättchen gesponnen. Danach werden die Fasern mit Plasma behandelt, um Carboxylgruppen zu generieren. Die plasmaaktivierten PLLA-Fasern werden in 0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3) für 30 Minuten gewaschen (12 Wellplate). Danach muss der MES-Puffer entfernt werden, um die aktivierten PLLA-Fasern in 8,69 mM EDC und 4,35 mM Sulfo-NHS (0,1 M MES-Puffer (pH = 5,3)) für 90 Minuten zu inkubieren. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln durchgeführt. Zu Immobilisierung werden die PLLA-Fasern in einer 0,1 mg/mL zyklischRGD-Lösung (165,8 µM) in 0,1 M PBS (pH = 7,4)

für 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 6 Stunden wird die Peptidlösung abpipettiert und das durch die physikalischen Wechselwirkungen schwach angebundene zyklische RGD-Peptid durch Waschen mit PBS entfernt.

## **5.5 Zellkulturen**

### **5.5.1 Zellkulturen mit hMSC**

Die folgenden Tätigkeiten wurden von unserem Kooperationspartner der Orthopädie Marburg durchgeführt. Humane Mesenchymale Stammzellen wurden von eingewilligten Spendern nach den vorgeschriebenen Bestimmungen entnommen. Bei den Spendern gab es keinen Hinweis auf andere Knochen- oder Autoimmun-Krankheiten außer der bestehenden Osteoarthritis des Hüftknochens. Der Oberschenkelknochen wurde bei einer routinemäßigen Präparation eines Implantatbetts entnommen. Humane Mesenchymale Stammzellen wurden entsprechend der Vorgehensweise von PITTENGER et al<sup>[196]</sup> isoliert und kultiviert. Mit kleinen Modifikationen nach BRENDDEL<sup>[197]</sup> wurde die weitere Behandlung durchgeführt.

#### **5.5.1.1 Präparation von Knochenspongiosa**

Unter einer Sterilbank wird die zuvor entnommene Spongiosa in PBS zerkleinert und in ein 50 ml Falconröhrchen gefiltert. In einem weiteren Falconröhrchen werden 15 ml Ficoll-Paque vorgelegt. Dieses wird dann mit dem abgefilterten Spongiosa-PBS-Gemisch vorsichtig überschichtet und anschließend zentrifugiert (800g, 19°C, 25 min).

Aus der sich resultierenden Schichtung werden die mononuclearen Zellen mit einer Kunststoffpipette abgenommen, in ein leeres Falconröhrchen übertragen, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert (300g, 19°C, 5 min).

Im Anschluss daran wird der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach einem letzten Zentrifugationsvorgang (300g, 19°C, 5 min) wird erneut der Überstand verworfen, das Pellet jedoch mit 12 ml Kulturmedium resuspendiert und einer mittlere Kulturflasche zugefügt. Im Brutschrank bei 37°C, können die mesenchymalen Stammzellen über Nacht adhärieren. Am nächsten Tag wird der non-

adhärente Zellüberstand durch mehrmaliges Spülen mit PBS verworfen. Die verbleibenden MSC werden mit frischem Medium versorgt. Es schließt sich ein regelmäßiger Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage an, bis die Zellen konfluent sind. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte noch einmal dargestellt:

- Spongiosa in PBS zerkleinern und filtern
- Spongiosa-PBS-Filtrat in Falconröhrchen vorlegen
- 15 ml Ficoll-Paque in weiterem 50 ml Falconröhrchen vorlegen und mit Blut-PBS-Gemisch vorsichtig überschichten
- Abzentrifugieren: 800 g, 19°C, 25 min
- Mono-Nucleare Zellen mit einer Einmalkunststoffpipette abnehmen und in ein 50 ml Falconröhrchen geben
- Mit PBS auf 50 ml auffüllen
- Abzentrifugieren: 300 g, 19°C, 5 min
- Überstand verwerfen
- Zellpellet in 10 ml PBS resuspendieren und erneut mit PBS auf 50 ml auffüllen
- Abzentrifugieren: 300 g, 19°C, 5 min
- Überstand verwerfen
- Mit 12 ml Medium resuspendieren und in eine mittlere Kulturflasche überführen
- Bei 37°C im Brutschrank (5% CO<sup>2</sup>) in Kultur halten

#### **5.5.1.2 Passagieren / Trypsinisieren**

Ist der Flaschenboden konfluent (zu 70% bewachsen) besteht die Möglichkeit die Zellen mit Hilfe von Trypsin abzulösen, um diese weiter in Kultur zu halten, bzw. ein Vermehren der Zellkultur zu ermöglichen.

Dazu wird das Kulturmedium der MSC in ein Falconröhrchen vorgelegt. Mit 10 ml PBS wird dann die Kulturflasche gespült und der Boden anschließend mit 2 ml Trypsin bedeckt. Zum Ablösen der Zellen inkubiert man die Flasche ca. 5 min in dem Brutschrank. Durch beklopfen der Flasche lösen sich die Zellen meist sehr gut, so dass man diese dann mit dem vorgelegten Kulturmedium (10 ml) herauspülen kann. Zusätzlich spült man 1 bis 2 mal mit PBS nach und

zentrifugiert die Zellen ab (300 g, 19°C, 5 min). Das Pellet wird mit PBS resuspendiert, auf 50 ml aufgefüllt und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in Medium aufgenommen und erneut in Kulturflaschen überführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte noch einmal dargestellt:

- Kulturmedium in Falconröhrchen vorlegen
- Mit 10 ml PBS Kulturflasche spülen
- Nach 5 Minuten Inkubationszeit der Zellen mit 2 ml Trypsin im Brutschrank durch Klopfen der Flasche Zellen vom Boden lösen
- Kulturflasche mit vorgelegten Medium durchspülen
- Mit PBS nachspülen
- Zellen abzentrifugieren
- Überstand verworfen
- Pellet mit PBS resuspendieren und auf 50 ml auffüllen
- Abzentrifugieren und Überstand verworfen
- Mit Medium die MSC resuspendieren und in Kulturflaschen überführen
- Bei 37 °C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) in Kultur halten

### **Standardmedium für hMSC**

Für den Ansatz des Standardmediums für hMSC werden folgende Komponenten verwendet:

- 500 ml DMEM low Glucose
- 10% FCS
- 1% Penicillin / Streptomycin

### **Differenzierungsmedium (Osteogenesis Induction Medium) (OIM)**

Für den Ansatz des Differenzierungsmediums für hMSC werden folgende Komponenten verwendet:

- 500 ml DMEM low Glucose
- 10 % FCS
- 5 ml Penicillin / Streptomycin
- 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat (1,08 g steril filtrieren)
- 0,05 mM Ascorbin-Acid-2-Phosphate (0,25 M stock) (10  $\mu$ l pro 50 ml Medium) (Frisch dazugeben)
- 0,1  $\mu$ M Dexamethason (1 mM stock in 100% Ethanol) (Frisch dazugeben)

Die Zubereitung von Dexamethason wird wie folgt durchgeführt. 2 mg Dexamethason wird mit 5 mL Ethanol(absolut) versetzt (Konzentration = 1mM). 5  $\mu$ L dieses Stocklösung werden mit 1 mL Medium versetzt (70  $\mu$ L Stocklösung mit 37 mL Medium; 95  $\mu$ L Stocklösung mit 50 mL Medium)

#### **5.5.1.3 Analyse der Genexpression**

Zur Analyse der RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden kultivierte Zellen mit einem RNeasy Mini Kit (von QIAGEN) nach Anleitung des Herstellers extrahiert und spektroskopisch quantifiziert. Es wurden zyklische Temperaturen und Inkubationszeiten für die humane Alkalische Phosphatase (AP), Osteopontin (OP), Kollagen (Typ I), Osteokalzin (OC) und 18s rRNA durchgeführt. Die Reinheit der einzelnen PCR-Produkte wurde über die Schmelzpunktanalyse bestimmt.

#### **5.5.1.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Die fixierten Proben wurden mit PBS gewaschen und mit den primären Antikörpern gegen Osteokalzin (BP710, von ACRIS), Kollagen-I (Ab6308, von ABCAM), Osteopontin (Ab8448, von ABCAM) inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (cy-2 und cy-3-konjugiert von DIANOVA) zugegeben. Danach wurde für 30 Minuten DAPI zugegeben und anschließend mit PBS gewaschen.

## **5.5.2 Zellkulturen mit Pigmentepithelzellen**

### **5.5.2.1 Retinale Pimentepithelzellen (RPE)**

#### **ARPE-19 Zellkultur**

Die Arbeiten mit den folgenden Zellkulturen wurden von der Augenklinik Aachen durchgeführt. Die humane ARPE-19 Zelllinie ist spontan aus Retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) eines 19-jährigen männlichen Spenders entstanden. In Kultur gehaltene ARPE-19 Zellen wachsen in Kulturgefäßen unter optimalen Bedingungen zu einem konfluenten einschichtigen Zellrasen. Ist der Zustand der Konfluenz erreicht, teilen sich die Zellen nicht weiter. Nach einer Stagnationsphase treten die Zellen in eine Absterbephase ein. Um einerseits dieses Absterben zu verhindern und andererseits die Zellkultur zu vermehren, wird die ARPE-19-Zellkultur vor der Konfluenz auf mehrere Kulturgefäße aufgeteilt (passagiert).

Das Passagieren der Zellen mit frischem erwärmtem Komplettmedium erfolgt alle 48 bzw. 72 Stunden. Zuerst wird die Zelldichte mikroskopisch festgestellt. Bei einer Zelldichte größer als Semikonfluenz, d.h. mehr als 150 Zellen pro mm<sup>2</sup>, müssen die Zellen auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt werden. Unter sterilen Bedingungen werden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen, bevor 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben wird, so dass alle Zellen mit der Protease in Kontakt kommen.

Während der 5-10 minütigen Inkubation bei 37 °C spaltet Trypsin die Peptidbindungen von Proteinen und sorgt so für die Ablösung der Zellen vom Untergrund und von benachbarten Zellen. Sobald sich die Zellen abrunden wird die Zellsuspension in Komplettmedium überführt um die Enzymaktivität des Trypsins zu stoppen und anschließend 10 Minuten bei 1.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation abgesaugt und das Zellpellet mit Komplettmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird je nach Zelldichte in einer Verdünnung von 1 zu 3 oder 1 zu 5 auf neue Kulturgefäße aufgeteilt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt, wobei zweimal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt wird.

### **Präparation von bovinen Augen zur Gewinnung von primären Retinalen Pigmentpithelzellen (RPE) für die Zellkultur**

Die Augen werden von Bindegewebe befreit und in PBS (phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) auf Eis gesammelt. Zur Reinigung werden die Augen für 2 min in 70%igem Ethanol eingelegt. Anschließend werden sie in sterilem PBS unter der Sterilbank gelagert. Die Präparation findet unter sterilen Bedingungen statt, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Das Auge wird am Limbus eröffnet und der vordere Augenabschnitt entlang der *Ora serrata* vollständig entfernt.

Für die RPE-Präparation wird der Glaskörper aus dem Bulbus entfernt, die Netzhaut mit PBS vom darunter liegenden RPE abgespült und mit einem Skalpell vom Sehnerv getrennt. Der Augenbecher wird in eine große Petrischale gesetzt und zunächst mit PBS gefüllt, bis drei Bulbi präpariert sind. Dann wird das PBS durch Trypsin ersetzt und die Gewebe bei 37 °C für 15 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Zugabe von Komplettmedium mit 10 % FBS gestoppt. Vereinzelte RPE Zellen werden gewonnen, indem man mit einer im Bunsenbrenner umgebogenen und geschliffenen Pasteurpipette im Augenbecher das RPE vorsichtig von der Bruch'schen Membran schabt, ohne die darunter gelegene Choroidea zu verletzen. Die Zellsuspension aller Bulbi wird in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt.

Nach Vereinzeln der Zellen in Suspension wird eine Probe von ca. 200 µl für die Zellzählung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Während der Zellzählung wird das Falconröhrchen 10 min bei 1.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Das Zellpellet wird in Komplettmedium resuspendiert und die Zellzahl auf die gewünschte Zelldichte pro ml eingestellt. Abschließend werden die Zellen in Sechslöchplatten oder auf Fasern in einer Dichte von 100.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Zur Kultivierung auf Nanofasern werden diese zusammen mit einer Lage steriler Gaze zur Stabilisierung in sog. *Cell Crown* Kulturinserts (bestehend aus einem Schaft und einem Ring) eingespannt. Diese Inserts können in 24-Lochplatten eingehängt werden, so dass Medium von der apikalen und basalen Seite an das Zell-Substrat-Konstrukt gelangt.

Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt, ein Mediumwechsel findet zweimal pro Woche statt.



### 5.5.2.2 Irispigmentepithelzellen (IPE)

Die Iris wird im Vorderabschnitt des Auges von der Hornhaut und Linse gelöst und mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten, so dass kein Pigmentepithel des Ciliarkörpers vorhanden ist. Bis zu sechs Iritiden werden in einer kleinen Petrischale mit 0,25%igem Trypsin bedeckt und 15 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt, indem das Trypsin abgesaugt und serumhaltiges Komplettmedium zugegeben wird. Um IPE Zellen zu vereinzeln werden die Iritiden in der Petrischale mit einer Glaspasteurpipette (s.o.) vorsichtig abgeschabt und die dunkel getrübbte Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen übertragen. Die Zellen aller Iritiden werden gesammelt. Das weitere Vorgehen, Zellzählung, Aussaat und Kultivierung erfolgt analog zu RPE-Zellen.

Das verwendete Komplettmedium besteht aus:

- 1:1 DMEM/HAM's F12 (Firma Biochrom AG, Berlin)
- 10% FBS (Fetales Kälberserum)
- 0,8% Penicillin/Streptomycin (Antibiotikum)
- 1,0% Amphotericin B (Antimykotikum)

## **5.6 Verwendete Geräte**

### **5.6.1 Optische Mikroskopie**

Auflichtmikroskopische Charakterisierungen von Fasern wurden mit dem Mikroskop VHX Digital Microscope mit dem Objektiv VH-Z500 der Firma KEYENCE durchgeführt.

Für die Arbeiten mit Pigmentepithelzellen wurden die Licht- und Fluoreszenzmikroskope DM IRB/E und DM 6000B der Firma LEICA genutzt.

### **5.6.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Es wurden das Rasterelektronenmikroskop JSM-7500F der Firma JEOL mit Kryotransfersystem der Firma GATAN verwendet.

Die SEM-Proben wurden auf Siliziumträgern präpariert und mit entsprechenden Klebestreifen auf dem Probenträger fixiert. Für die Untersuchungen mit dem JSM-7500F wurde eine Platin-Bedampfung in der Einschleusekammer im Gerät selbst durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung wurde probenabhängig zwischen 2 und 5 kV im LEI- oder SEI-Mode gewählt. Die Auswertung der Faserdurchmesser erfolgte mit der Software „ImageJ“ und „Origin“.

### **5.6.3 Fluoreszenzmikroskop**

Für die Arbeiten mit hMSC wurden die Fluoreszenzmikroskope des Typs DMR-X und für die Auswertungen der Immunfluoreszenz ein DM5000 der Firma LEICA, Wetzlar genutzt. Dazu wurden Mikrofotogramme von drei verschiedenen Bereichen gemacht. Die Intensität der Bereiche mit Fluoreszenz wurde mit der *Quips Analyse Software* bestimmt. Die Gesamtzellanzahl wurde über die DAPI gefärbten Zellkernen erhalten. Der Proliferationsindex wurde durch das Verhältnis von Ki-67 positiv gegen Gesamtzellanzahl bestimmt.

Für die Arbeiten mit Pigmentepithelzellen wurden die Fluoreszenzmikroskope DM IRB/E und DM 6000B der Firma LEICA genutzt.

#### **5.6.4 Konfokales Fluoreszenzmikroskop**

Zur Untersuchung der mit Alexa 555 und FITC-RGD immobilisierten Fasern wurde das Konfokalmikroskop TCS SP2 der Firma LEICA verwendet. Die Aufnahmen wurden im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg von Dr. Franz Grolig durchgeführt.

#### **5.6.5 Rasterkraftmikroskop**

Für Untersuchungen der Oberflächenrauheit der PLLA-Filmen wurde das Rasterkraftmikroskop Nanosurf<sup>®</sup> easyScan 2 eingesetzt. Die Blattfeder (Cantilever) blieb dabei im Kontakt mit der Oberfläche. Die Kraft zwischen der Spitze und der Probe blieb gleich (*contact force mode*). Die Auswertung erfolgte mit der Software *Nanosurf Report 4.1*.

#### **5.6.6 Zug-Dehnungs-Messungen**

Es wurde das Zug-Dehnungs-Messgerät *zwicki-Line* von Zwick GmbH & Co. KG, Ulm verwendet. Es wurden die Zuglast in Newton und die Dehnung in Millimeter ermittelt. Die Zugfestigkeit, die Dehnung und das Elastizitätsmodul wurden mit der Software von Zwick GmbH & Co. KG, Ulm ausgewertet.

#### **5.6.7 Kontaktwinkelmessungen**

Die statistischen Kontaktwinkel von Wasser wurden mit dem manuellen Kontaktwinkelmessgerät G 10 von der Firma Krüss (Hamburg) bestimmt und mit dem Programm SCA20 der Firma Data Physics ausgewertet.

### 5.6.8 Plasmagenerator

Die Faserproben wurden in den Plasmagenerator *Edwards MPG 137 RF power generator* gestellt und bis zu einem Niederdruck von 0,0133 mbar evakuiert. Anschließend wurde die Kammer mit Sauerstoff bis zu einem Innendruck von 0,133 mbar gefüllt. Zur Erzeugung des Sauerstoffplasmas wurden 30 Watt (reflected power) und 100 Watt (forward power) für eine Zeitdauer von 1 bis 10 Minuten eingestellt. Es wurde ein Gitterstrom von 6 mA erreicht. Der Anodenstrom zeigte 2 Ampere an. Zur Entnahme der Faserproben wurde die Kammer mit Außenluft gefüllt und Proben vorsichtig entnommen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] B. Schöttle, G. M. Oettl, J. D. Agneskirchner, A. B. Imhoff; *Orthopädie* **2001**, 30, 53-58
- [2] C. Liebau, R. Krämer, H. Haak, A. Baltzer, J. Arnold, H. Merk, R. Krauspe; *Arthroskopie* **2000**, 13, 94-98
- [3] M. Brittberg; *Operative Orthopädie und Traumatologie* **2001**, 3, 198-207
- [4] A. Greiner, J. H. Wendorff; *Angewandte Chemie* **2007**, 46, 5670-5703
- [5] S. Bierbaum, T. Douglas, T. Hanke, D. Scharnweber, S. Tippelt, T. K. Monsees, R. H. Funk, H. Worch; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; **2006**, 77, 551-562
- [6] J. Mayer, J. Blum; E. Wintermantel; *Medizintechnik, 5 Life Science Engineering* erschienen in Springer Verlag Berlin Heidelberg **2009**
- [7] R. Dersch, A. Greiner, M. Steinhart, J. H. Wendorff; *Chemie in unserer Zeit* **2005**, 39, 26-35
- [8] R. Dersch; *Dissertation*, Marburg **2006**
- [9] M. Stasiak; *Dissertation*, Marburg **2007**
- [10] C. B. Huang, S. L. Chen, C. L. Lai, D. H. Reneker, H. Qiu, Y. Ye, H. Q. Hou; *Nanotechnology* **2006**, 17, 1558-1563
- [11] A. Formhals; *DRP 584801*, 1929
- [12] A. Holzmeister; *Diplomarbeit*, Marburg **2006**
- [13] G. I. Taylor; *Proc. R. Soc. London, Ser. A.* **1964**, 280, 383-397
- [14] P. K. Baumgarten; *J. Colloid and Interface Science* **1971**, 36(1), 71-79
- [15] L. Larrondo, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna; *J. Polymer Science* **1981**, 19, 909-920
- [16] A. L. Yarin, S. Koombhongse, D. H. Reneker; *J. Appl. Phys.* **2001**, 90, 4836-4846
- [17] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge; *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78, 1149-1151
- [18] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, S. Koombhongse; *J. Appl. Phys.* **2000**, 87, 4531-4547.
- [19] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna; *Composites Science and Technology* **2003**, 63, 2223-2253
- [20] J. Zeng; *Dissertation*, Marburg, **2003**.

- [21] X. H. Zhong, K. S. Kim, D. F. Fang, S. F. Ran, B. S. Hsiao, B. Chu; *Polymer* **2002**, *43*, 4403-4412
- [22] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, Z. Ma; *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, 1. Auflage, World Scientific, Singapore **2005**
- [23] L. A. Daily, T. Schmehl, T. Gessler, M. Wittmar, F. Grimming, W. Seeger, T. Kissel; *J. Controlled Release* **2003**, *86(1)*, 131-144
- [24] J. Doshi, D. H. Reneker; *J. of Electrostatics* **1995**, *35(2-3)*, 151-160
- [25] M. Srinivasarao, D. Collings, A. Philips, S. Patel; *Science* **2001**, *292*, 79-83
- [26] C. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase, J. F. Rabolt; *Macromolecules* **2004**, *37*, 573-578
- [27] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, M. P. Brenner; *Physics of fluids* **2001**, *13(8)*, 2201-2220
- [28] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, M. P. Brenner; *Physics of fluids* **2001**, *13(8)*, 2221-2236
- [29] H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker; *Polymer* **1999**, *40*, 4585-4592
- [30] W. Zuo, M. Zhu, W. Yang, H. Yu, Y. Chen, Y. Zhang; *Polymer Engineering and Science* **2005**, *45*, 704-709
- [31] Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner; *e-Polymers* **2003**, *9*, 1-9
- [32] S. Koombhongse, W. Liu, D. H. Reneker; *J. of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* **2001**, *39*, 2598-2606
- [33] D. H. Reneker, I. Chun; *Nanotechnology* **1996**, *7*, 216-223
- [34] N. L. Nerukar, D. M. Elliott, R. L. Mauck; *J. Of Orthopaedic Research* **2007**, *25*, 1018-1028
- [35] R. Dersch, T. Liu, A. K. Schaper, A. Greiner, J. H. Wendorff; *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 545-553
- [36] B. C. Heng, T. Cao, L. W. Stanton, P. Robson, B. Olsen; *J. Bone and Mineral Res.* **2004**, *19(9)*, 1379-1394
- [37] B. Kirchhof; *Deutsches Ärzteblatt* **2000**, *97(21)*, 1458-1462
- [38] <http://www.tagesschau.de/ausland/organhandel100.html> (23.09.2009)
- [39] E. Exner, C. Müller, H. Schmidt; *Bionik*, Springer Berlin Heidelberg **2005**
- [40] J. W. Luc et al; *Nature* **2000**, *407*, 90-94
- [41] R. Langer, J. P. Vacanti; *Science* **1993**, *260*, 920-926
- [42] C. T. Laurencin, A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden; J. A. Cooper, Jr; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, *1*, 19-46

- [43] O. E. Teebken, T. Kofidis, P. Akhyari, A. Haverich; *Zentralblatt Chirurgie* **2007**, 132, 236-246
- [44] J. P. Vacanti, R. Langer; *Lancet* **1999**, 354, 32-34
- [45] Y. Ikada; *Journal of Royal Society* **2006**, 3, 589-601
- [46] <http://de.wikipedia.org/wiki/Eigenbluttherapie> (23.09.2009)
- [47] T. A. Mayhew, G. R. Williams, M. A. Senica, G. Mayhew, G. C. Du Moulin; *Tissue Engineering* **1998**, 4(3), 325-334
- [48] I. L. Weissman, *Science* **2000**, 287, 1442-1446
- [49] M. F. Pittenger et. al.; *Science* **1999**, 284, 143-146
- [50] B. C. Heng, T. Cao, L. W. Stanton, P. Robson, B. Olsen; *J. Of Bone and Mineral Research* **2004**, 19(9), 1379-1394
- [51] C. A. Rockwood; D. P. Green; *Rockwood and Green`s fractures in adults*, Vol 1, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, **1996**
- [52] G. Thumann, B. Kirchhof; *Ophthalmologe* **2004**, 101, 882-885
- [53] S. Zhao, L. J. Rizzolo, C. J. Barnstable; *International Review of Cytology* **1997**, 171, 225-266
- [54] G. Thumann; *Survey of Ophthalmology* **2001**, 45(4), 345-354
- [55] N. Kociok, H. Heppekausen, U. Schraermeyer, P. Esser, G. Thumann, S. Grisanti, K. Heimann; *Experimental Eye Research* **1998**, 67, 237-250
- [56] [http://de.wikipedia.org/wiki/Extrazelluläre\\_Matrix](http://de.wikipedia.org/wiki/Extrazelluläre_Matrix) (23.09.2009)
- [57] <http://www.uni-muenster.de/Rektorat/muz/foto/muz9975d.jpg> (23.09.2009)
- [58] <http://de.wikipedia.org/wiki/RGD-Sequenz> (23.09.2009)
- [59] <http://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran> (23.09.2009)
- [60] R. O. Hynes; *Cell* **2002**, 110(6), 673-687
- [61] N. Umeda, S. Kachi, H. Akiyama, G. Zahn, D. Vossmeier, R. Stragies, P. A. Campochiaro; *Mol. Pharmacol.* **2006**, 69, 1820-1828
- [62] T. Dietrich, J. Onderka, F. Bock, G. Zahn, R. Stragies, F. E. Kruse, C. Cursiefen; *J. Am. Path.*, **2007**, Mai 24
- [63] D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler; *Angewandte Chemie In. Ed. Engl.* **2007**, 46(19), 3571-3574
- [64] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher; *Science* **1987**, 238, 491-497
- [65] R. G. Lebaron, K. A. Athanasiou; *Tissue Engineering* **2000**, 6, 85-103
- [66] R. O. Hynes; *Cell* **1992**, 69, 11-25
- [67] A. R. Horwitz, J. T. Parsons; *Science* **1999**, 286, 1002-1003

- [68] K.-E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler; *Protein Science* **2002**, *11*, 1800-1812
- [69] M. Rudisile, *Dissertation* **2008**
- [70] [http://www.tankonyvtar.hu/site/upload/2008/09/kepek\\_004-anat.jpg](http://www.tankonyvtar.hu/site/upload/2008/09/kepek_004-anat.jpg) (23.09.2009)
- [71] J. P. Bilezikian ; *Principles of bone biology*, Academic Press, San Diego, **1996**
- [72] H. Dobnig, R. T. Turner; *Endocrinology* **1995**, *136*, 3632-3638
- [73] <http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/cells.html> (23.09.2009)
- [74] E. A. Cowles, M. E. DeRome, G. Pastizzo, L. L. Brailey, G. A. Gronowicz; *Calcified Tissue International* **1998**, *62*, 74-82
- [75] M. A. Attawia, K. M. Herbert, K. E. Uhrich, R. Langer, C. T. Laurencin; *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *48*, 322
- [76] M. J. Somerman, L. W. Fisher, R. A. Foster, J. J. Sauk; *Calcified Tissue International* **1988**, *43*, 50-53
- [77] B. S. Noble, J. Reeve; *Molecular Cellular Endocrinology* **2000**, *159*, 7-13
- [78] C. Gundberg; *Clinics in Laboratory Medicine* **2000**, *20*, 489
- [79] C. M. Gundberg, A. C. Looker, S. D. Nieman, M. S. Calvo; *Bone (N. Y., NY, U. S.)* **2002**, *31*, 703
- [80] L. C. Hofbauer, C. Shui, B. L. Riggs, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, T. O'Brien, S. Khosla; *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *280*, 334-339
- [81] B. C. Heng, T. Cao, L. W. Stanton, P. Robson, B. Olsen; *Journal of Bone and Mineral Research* **2004**, *19*, 1379-1394
- [82] [http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/os/pcd\\_imgs/img0042.jpg](http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/os/pcd_imgs/img0042.jpg) (23.09.2009)
- [83] M. P. Lynch, C. Capparelli, J. L. Stein, G. S. Stein, J. B. Lian; *Journal of Cellular Biochemistry* **1998**, *68*, 31-49
- [84] <http://de.wikipedia.org/wiki/Netzhaut> (23.09.2009)
- [85] <http://www.dma.ufg.ac.at/assets/16457/intern/retina.jpg> (23.09.2009)
- [86] <http://de.wikipedia.org/wiki/Makuladegeneration> (24.09.2009)
- [87] R. D. Jager, F. M. William, J. W. Miller; *The New England Journal of Medicine* **2008**, *358*(24), 2606-2617
- [88] G. Thumann; *Tissue engineering von Pigmentepithelzellen zur subretinalen Transplantation*, Sonderseminar Marburg, **2008**
- [89] G. Thumann, P. Walter; *Klinische Monatsblätter der Augenheilkunde* **2008**, *225*, 699-702



- [90] P. V. Alverre, P. Gouras, K. E. Dørgard ; *European Journal of Ophthalmology* **1999**, 9(3), 217-230
- [91] A. Lappas, A. M. Foerster, A. W. Weinberger et al; *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **2004**, 242(8), 638-647
- [92] G. Thumann, S. Aisenbrey, U. Schraermeyer et al ; *Archives of Ophthalmology* **2000**, 21(4), 293-303
- [93] A. M. Joussen, F. M. Heussen, S. Joeres et al; *American Journal of Ophthalmology* **2006**, 142(1), 17-30
- [94] R. E. MacLaren, G. S. Uppal, K. S. Balaggan et al; *Ophthalmology* **2007**, 114(3), 561-570
- [95] G. Thumann, U. Schraermeyer; *Current eye research* **1997**, 16(12), 1236-1238
- [96] U. Schraermeyer, P. Kayatz, G. Thumann, T. T. Luther, P. Szurman, N. Kociok, K. U. Bartz-Schmidt; *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **2000**, 238(12), 979-984
- [97] G. Thumann; *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **2002**, 240, 695-697
- [98] G. Thumann et al; *Current eye research* **2006**, 31, 241-249
- [99] G. Thumann, A. Viethen, A. Gaebler, P. Walter, S. Kaempf, S. Johnen, A. K. Salz; *Biomaterials* **2008**, 30(3), 287-294
- [100] J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, G. L. Bowlin; *Biomacromolecules* **2002**, 3, 232-238
- [101] M. Li, M. J. Mondrinos, M. R. Gandhi, F. K. Ko, A. S. Weiss, P. I. Lekes; *Biomaterials*, **2005**, 26, 5999-6008
- [102] K. S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. Seo, Y. J. Park, S. Hong, S. Roh, J. J. Cho, W. H. Park, B. Min, *Biomaterials* **2006**, 27, 1452-1461
- [103] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, Z. Huang, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* **2005**, 72B, 156-165
- [104] G. E. Wnek, M. E. Carr, D. G. Simpson, G. L. Bowlin; *Nano Letters* **2003**, 3, 213-216
- [105] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto; *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25, 1600-1605
- [106] P. Kulpinski; *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 98, 1855-1859
- [107] C. Kim, M. W. Frey, M. Marquez, Y. L. Joo; *Journal of Polymer Science Part B* **2005**, 43, 1673
- [108] I. H. Liu, Y. Hsieh; *Journal of Polymer Science Part B* **2002**, 40, 2119
- [109] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, B. Chu; *Polymer* **2002**, 43, 4403-4412

- 
- [110] M. Bognitzki, W. Czado, T. Frese, A. Schaper, M. Hellwig, M. Steinhart, A. Greiner, J. H. Wendroff; *Advanced Materials* **2001**, *13*, 70-72
- [111] E. Kenawy, G. L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D. G. Simpson, E. H. Sanders, G. E. Wnek; *Journal of Controlled Release* **2002**, *81*, 57-64
- [112] H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, J. P. Vacanti; *Biomaterials* **2003**, *24*, 2077-2082
- [113] J. Venugopal, L. L. Ma, T. Yong, S. Ramakrishna; *Cell Biology International* **2005**, *29*, 861-867
- [114] Y. Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C. T. Lim, S. Ramakrishna; *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1049-1057
- [115] E. D. Boland, T. A. Telemeco, D. G. Simpson, G. E. Wnek, G. L. Bowlin; *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2004**, *71*, 144-152
- [116] Y. You, B. Min, S. J. Lee, T. S. Lee, W. H. Park; *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, *95*, 193-200
- [117] S. A. Riboldi, M. Sampaolesi, P. Neuenschwander, G. Cossu, S. Mantero; *Biomaterials* **2005**, *26*, 4606-4615
- [118] J. J. Stankus, J. Guan, K. Fujimoto, W. R. Wagner; *Biomaterials* **2005**, *27*, 735-744
- [119] J. Guan, J. J. Stankus, W. R. Wagner; *J. Controlled Release* **2007**, *120*, 70-78
- [120] S. A. Riboldi, N. Sadr, L. Pignini, P. Neuenschwander, M. Simonet, P. Mognol, M. Sampaolesi, G. Cossu, S. Mantero; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2008**, *84A*, 1094-1101
- [121] W. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, F. K. Ko; *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *60*, 613-621
- [122] X. Zong, S. Ran, K. Kim, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 416-423
- [123] X. Zong, H. Bien, C. Chung, L. Yin, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, E. Entcheva; *Biomaterials* **2005**, *26*, 5330-5338
- [124] L. I. Ramdhanie, S. R. Aubuchon, E. D. Boland, D. C. Knapp, C. P. Barnes, D. G. Simpson, G. E. Wnek, G. L. Bowlin; *Polymer Journal* **2006**, *38*, 1137-1145
- [125] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna; *Biomaterials* **2004**, *25*, 877-886
- [126] X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna; *Biomaterials* **2004**, *25*, 1883-1890
- [127] I. K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda; *Biomaterials* **2005**, *26*, 3929-3939
- [128] K. E. Park, H. K. Kang, S. J. Lee, B. Min, W. H. Park; *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 635-643

- [129] M. Peesan, R. Rujiravanit, P. Supaphol; *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2006**, 17(5), 547-565
- [130] J. R. Venugopal, Y. Zhang, S. Ramakrishna; *Artificial Organs* **2006**, 30, 440-446
- [131] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey; *Biomaterials* 2007, 28, 3012-3025
- [132] S. Srouji, T. Kizhner, E. Suss-Tobi, E. Livne, E. Zussman; *Journal of Materials Science:Materials in Medicine* **2008**, 19, 1249-1255
- [133] I. K. Kwon, T. Matsuda; *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2096-2105
- [134] W. He, T. Yong, W. E. Teo, Z. Ma, S. Ramakrishna; *Tissue Engineering* **2005**, 11(9-10), 1574-1588
- [135] W. Meng, S. Kim, J. Yuan, J. C. Kim, O. H. Kwon, N. Kawazoe, G. Chen, Y. Ito, I. Kang; *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, 18, 81-94
- [136] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. Huang, C. T. Lim, S. Ramakrishna; *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2583-2589
- [137] R. Chen, S. J. Curran, J. M. Curran, J. A. Hunt ; *Biomaterials* **2006**, 27, 4453-4460
- [138] C. Chollet, C. Chanseau, B. Brouillaud, M. C. Durrieu; *Biomolecular Engineering* **2007**, 24, 477-482
- [139] M.-H. Ho, J.-J. Lee, S.-C. Fan, D.-M. Wang, L. T. Hou, H.-J. Hsieh, J.-Y. Lai; *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, 467-474
- [140] R. M. Thire, T. O. Meiga, S. Dick, L. R. Andrade; *Macromolecular Symposia* **2007**, 258, 38-44
- [141] Y. Zhu, Y. Sun; *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **2004**, 36(1), 49-55
- [142] H. Sun, A. Wirsén, A.-C. Albertsson; *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2275-2280
- [143] H. Takahashi, K. Emoto, M. Dubey, D. G. Castner, D. W. Grainger; *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, 2079-2088
- [144] K. Cai, K. Yao, Y. Cui, Z. Yang, X. Li, H. Xie, T. Qing, L. Gao; *Biomaterials* **2002**, 23(7), 1603-1611
- [145] Q. Hou, R. Freeman, L. Buttery, K. M. Shakesheff; *Biomacromolecules* **2005**, 6(2), 734-740
- [146] X. Liu, Y. Won, P. X. Ma; *Journal of biomedical materials research, Part A* **2005**, 74A(1), 84-91
- [147] K. Cai, K. Yao, Z. Yang, X. Li ; *Acta Biomaterialia* **2007**, 3(4), 597-605
- [148] J. F. Alvarez-Barreto, V. I. Sikavitsas; *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, 579-588

- 
- [149] A. P. Khandwekar, D. P. Patil, V. Khandwekar, Y. S. Shouche, S. Sawant, M. Doble; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, 20(5), 1115-1129
- [150] E. S. Carlisle et. al.; *Tissue Engineering* **2000**, 6(1), 45-52
- [151] G. C. M. Steffens, L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, H. Höcker, D. Klee; *Biomaterials* **2002**, 23, 3523-3531
- [152] H. J. Jung, K.-D. Ahn, D. K. Han; *Macromolecular Research* **2005**, 13(5), 446-452
- [153] M.-H. Ho, L.-T. Hou, C.-Y. Tu, H.-J. Hsieh, J.-Y. Lai, W.-J. Chen, D.-M. Wang ; *Macromolecular Bioscience* **2006**, 6, 90-98
- [154] M.-H. Ho, D.-M. Wang, L.-T. Hou, C.-Y. Tu, H.-J. Hsieh, J.-Y. Lai; *Desalination* **2006**, 200, 501-502
- [155] H. J. Jung, K. Park, K. J. Cho, K.-D. Ahn, D.-J. Ahn, D. K. Han; *Key Engineering Materials* **2007**, 342-343, 297-300
- [156] [http://de.wikipedia.org/wiki/Plasma\\_\(Physik\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Plasma_(Physik)) (Stand: 29.09.2009)
- [157] <http://www.fineline-technologie.de/images/plasma%202.jpg> (Stand: 30.09.2009)
- [158] <http://de.wikipedia.org/wiki/Oberflächenenergie> (Stand: 21.10.2009)
- [159] S. C. Baker, N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson, J. Southgate; *Biomaterials* **2006**, 27, 3136-3146
- [160] H. Park, K. Y. Lee, S. J. Lee, K. E. Park, W. H. Park; *Macromolecular Research* **2007**, 15(3), 238-243
- [161] K. E. Park, K. Y. Lee, S. J. Lee, W. H. Park; *Macromolecular Symposia* **2007**, 249-250, 103-108
- [162] A. Ndreu, L. Nikkola, H. Ylikauppila, N. Ashammakhi, V. Hasirci; *Nanomedicine* **2008**, 3(1), 45-60
- [163] H. S. Baek, Y. H. Park, C. S. Ki, J.-C. Park, D. K. Rah; *Surface and Coatings Technology* **2008**, 202(22-23), 5794-5797
- [164] L. Jeong, I.-S. Yeo, H. N. Kim, I. Y. Yoon, D. H. Jang, S. Y. Jung, B.-M. Min, W. H. Park; *International Journal of Biological Macromolecules* **2009**, 44(3), 222-228
- [165] M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, C. K. Chan, S. Ramakrishna; *Nanotechnology* **2008**, 19(45), 455102/1-455102/8
- [166] A. Martins, E. D. Pinho, S. Faria, I. Pashkuleva, A. P. Marques, R. L. Reis, N. M. Neves ; *Small* **2009**, 5(10), 1195-1206
- [167] K. Park, H. J. Jung, J.-J. Kim, K.-D. Ahn, D. K. Han; *Macromolecular Research* **2006**, 14(5), 552-558
-

- 
- [168] K. Park, Y. M. Ju, J. S. Son, K.-D. Ahn, D. K. Han ; *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, 18(4), 369-382
- [169] K. H. Lee, G. H. Kwon, S. J. Shin, J.-Y. Baek, D. K. Han, Y. Park, S. H. Lee; *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* **2009**, 90A, 619-628
- [170] Z. Ma, W. He, T. Yong, S. Ramakrishna; *Tissue Engineering* **2005**, 11(7/8), 1149-1158
- [171] W. He, Z. Ma, T. Yong, W. E. Teo, S. Ramakrishna; *Biomaterials* **2005**, 26, 7606-7615
- [172] Y. Duan, Z. Wang, W. Yan, S. Wang, S. Zhang, J. Jia; *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, 18(9), 1153-1164
- [173] W. He, Z. Ma, W. E. Teo, Y. X. Dong, P. A. Robless, T. C. Lim, S. Ramakrishna; *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* **2009**, 90A(1), 205-216
- [174] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, E. Seyedjafari, F. Babaeijandaghi, M. Soleimani; *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, 382, 129-133
- [175] F. Yang, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen; *Chemical Engineering Journal* **2008**, 137, 154-161
- [176] J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, A. B. Kumar, S. Ramakrishna; *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* **2008**, 85A(2), 408-417
- [177] S. P. Massia, S. S. Rao, J. A. Hubbell; *The Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268(11), 8053-8059
- [178] S. P. Massia, J. A. Hubbell; *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267(20), 14019-14026
- [179] S. P. Massia, J. A. Hubbell; *Analytical Biochemistry* **1990**, 187, 292-301
- [180] S. P. Massia, J. A. Hubbell; *The Journal of Cell Biology* **1991**, 114, 1089-1100
- [181] S. P. Massia, J. A. Hubbell; *Journal of Biomedical Materials Research* **1991**, 25, 223-242
- [182] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti; *The Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262(36), 17294-17298
- [183] T. G. Kim, T. G. Park; *Tissue Engineering* **2006**, 12(2), 221-233
- [184] H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, F. Tian, H. Kobayashi, Y. Tabata; *Biomaterials* **2006**, 27, 4079-4086
- [185] S.-Y. Gu, Z.-M. Wang, C.-Y. Zhang, J. Ren; *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74, 572-578
- [186] D. Grafahrend, J. L. Calvet, J. Salber, P. D. Dalton, M. Möller, D. Klee; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, 19, 1479-1484
- [187] W. S. Choi, J. W. Bae, H. R. Lim, Y. K. Joung, J.-C. Park, I. K. Kwon, K. D. Park; *Biomedical Materials* **2008**, 3, 044104(1-8)
-

- [188] D. Grafahrend, J. L. Calvet, K. Klinkhammer, J. Salber, P. D. Dalton, M. Möller, D. Klee; *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101*(3), 609- 621
- [189] W. Mattanavee, O. Suwantong, S. Puthong, T. Bunaprasert, V. P. Hoven, P. Supaphol; *ACS Applied Materials & Interfaces* **2009**, *1*(5), 1076-1085
- [190] J. Zeng, H. Hou, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner; *e-polymers* **2003**, *9*, 1-9
- [191] S. Maretschek, A. Greiner, T. Kissel; *Journal of Controlled Release* **2008**, *127*(2), 180-187
- [192] K. Kim, Y. K. Luu, C. Chang, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu et. al; *Journal of Controlled Release* **2004**, *98*(1), 47-56
- [193] A. Hautanen, J. Gailit, D. M. Mann, E. Ruoslahti; *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 1437-1442
- [194] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler; *Angewandte Chemie* **1997**, *109*, 1440-1456
- [195] M. D. Schofer, U. Boudriot, C. Wack, I. Leitfeld, C. Gräbedüinkel, R. Dersch et al; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, *20*, 767-774
- [196] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca et al; *Science* **1999**, *284*(5411), 143-147
- [197] C. Brendel, L. Kuklick, O. Hartmann, T. D. Kim, U. Boudriot, D. Schwell et al; *Gene Expression* **2005**, *12*(4-6), 245-257

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
µg	-	Mikrogramm
µm	-	Mikrometer
Abb.	-	Abbildung
AP	-	alkalische Phosphatase
cm	-	Zentimeter
d	-	Durchmesser
DCM	-	Dichlormethan
EZM	-	extrazelluläre Matrix
FDA	-	Food and Drug Administration (Zulassungsbehörde der USA)
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-RGD	-	Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes RGD
h	-	Stunde(n)
hMSC	-	humane mesenchymale Stammzellen
kV	-	Kilovolt
mg	-	Milligramm
mL	-	Milliliter
nm	-	Nanometer
OC	-	Osteokalzin
OP	-	Osteopontin
OPG	-	Osteoprotegerin
PBS	-	Phosphat-gepufferte Saline
PCL	-	Poly(ε-caprolacton)
PLLA	-	Poly(L-lactid)
RLU	-	relative Lichteinheiten
REM/SEM	-	Rasterelektronenmikroskop
wt. %	-	Gewichtsprozent
MES		<u>2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure</u>

## 7.2 Veröffentlichungen, Tagungen und Messeteilnahmen

### 7.2.1 Veröffentlichungen

#### **Effect of direct RGD incorporation in PLLA nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**

M. D. Schofer, U. Boudriot, S. Bockelmann, A. Walz, J. H. Wendorff, A. Greiner, J. R. J. Paletta und S. Fuchs-Winkelmann

*Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, 20, 1535-1540

#### **RGD-Functionalisation of PLLA Nanofibers by surface coupling using plasma treatment –Influence on stem cell differentiation-**

J. R. J. Paletta, S. Bockelmann, A. Walz, C. Theisen, J. H. Wendorff, A. Greiner, S. Fuchs-Winkelmann, M. D. Schofer

Eingereicht in 2009 in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*

Stand: in Revision



## 7.2.2 Tagungsteilnahmen

### **Chemical Nanotechnology Talks VII**

23.-25. Oktober 2006, Frankfurt (Dechema)

### **„Nano - Hier ist die Zukunft“**

9. November 2006, Gießen (Kongresshalle)

### **4. Materialforschungstag Mittelhessen *Nanohale: Nanorods for inhalation therapy* (Poster)**

20. Juni 2008, Marburg (Alte Aula)

A. Walz, A. Holzmeister, M. Rudisile, M. Thieme, R. Dersch, A. Greiner, J. H. Wendorff

### **5. Nanotechnologieforum Hessen**

Mit Nanotechnologien die Zukunft gestalten-Innovationspotenziale und Karrierechancen

13. November 2008, Frankfurt (Messe)

### **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien**

20.-22. November, Hamburg (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

### **8. InnovationsForum Hessen-Biotech -Workshop Insect Biotechnology**

Potenziale der Insect Biotechnology in Biotechnologie, Chemie und Pharma

9. Februar 2009, Frankfurt (Dechema)

### 7.2.3 Messeteilnahmen

#### **NanoSolutions 2007**

21.-23. November 2007 (Frankfurt)

#### **Hannover Messe 2008**

21.-25. April 2008 (Hannover), Gemeinschaftsstand TTN

#### **ACHEMA 2009**

11.-15. Mai 2009 (Frankfurt), Gemeinschaftsstand TTN

### 7.2.4 Erwähnungen

#### **AVRO 2009**, Fort Lauderdale (Florida)

„*Growth of IPE and RPE Cells on Biological and Artificial Substrata*” (Poster)

Anna Katharina Salz, Christiane Maltusch, Eva Peters, Anne Christine Rieck, Andrea Gaebler, Sandra Johnen, Andreas Walz, Peter Walter, Gabriele Thumann IZKF BIOMAT.“, Department of Ophthalmology, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, Department of Macromolecular Chemistry, Philipps-University, Marburg, Germany

#### **22. Jahrestagung der Retinologischen Gesellschaft 2009**, Berlin

Kurzvortrag: „*Entwicklung von Pigmentepithelzellfolien zur subretinalen Transplantation*“

Anna Katharina Salz, Gabriele Thumann (Universitäts-Augenklinik Aachen)

#### **Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) Tagung 2009**, Leipzig

„*Evaluierung natürlicher und synthetischer Materialien zur subretinalen Transplantation von Pigmentepithelzellen*“ (Poster)

Anna Katharina Salz, Gabriele Thumann (Universitäts-Augenklinik Aachen)

### **7.3 Eidesstattlicher Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Oberflächenfunktionalisierte Polymerfasermatrices für den Einsatz im Tissue Engineering“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe, angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

## 7.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Joachim H. Wendorff für die interessante Aufgabenstellung im Bereich des Tissue Engineerings bedanken. Durch die Möglichkeit weitgehend selbstständig zu arbeiten, Kontakte zu neuen Arbeitsgruppen zu knüpfen, an Tagungen und Messen teilzunehmen und neue Methoden kennen zu lernen und auszuprobieren konnte ich durch die Freiheit und das Vertrauen, die Herrn Prof. Dr. Joachim H. Wendorff mir schenkte, eine hohe Interdisziplinarität in den Fachrichtungen Chemie, Materialwissenschaften, Biologie, Pharmazie und Medizin erzielen. Für die zahlreichen interessanten Gespräche danke ich ihm sehr.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Dr. Roland Dersch und Dr. Markus Rudisile für die Einführung in das große Gebiet des Tissue Engineerings bedanken. Ohne die Vorarbeiten von Dr. Roland Dersch und die zahlreichen Diskussionen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür danke ich ihm sehr.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Wendorff aussprechen. Alle gemeinsam haben wir es geschafft noch im Jahr 2009 unsere Doktorarbeiten zu beenden. Meinen Vertiefern Oliver Carstensen, Thomas Ostapowicz, Alexander Wilbuer, Veronika Pape, Jinyuan Sun, Yi Zhang, Philipp Horsch, Kathrin Pieleles, Adrian Schiefler und Günther Thiele danke ich für die Unterstützung in den einzelnen Projekten.

Meinen Dank geht auch an Norbert Frommknecht und Werner Kröschel von der Elektronikwerkstatt für die Realisierung der elektronischen Geräte. Weiterhin möchte ich auch Friedbert Bepperling und Andreas Hedderich von der Feinmechanikwerkstatt der Physikalischen Chemie danken.

Einen großen Dank möchte ich auch an die AG Schaper richten. Durch die Hilfe von Michael Hellwig, Orhan Akbulut und Norbert Lessmann konnte ich mich schnell in der Rasterelektronenspektroskopie einarbeiten.

Weiterhin geht mein Dank an Regina Reul vom Institut für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie (AG Kissel) für die Möglichkeit, den Kettenabbau von PLLA über die Gel-Permeations-Chromatographie zu untersuchen.

Auch an Herrn Dr. Franz Grolig vom Fachbereich Biologie geht mein Dank für seine freundliche Art und die Bereitschaft mit mir am konfokalen Fluoreszenzmikroskop zu messen.

Auch unseren Kooperationspartnern im Bereich Medizin soll für die gute Zusammenarbeit gedankt werden. Hier sind Markus D. Schofer, Sarah Bockelmann, Jürgen. R. J. Paletta und Susanne Fuchs-Winkelmann von der Orthopädie Marburg zu nennen. In der Augenklinik Aachen wurde durch Anna Katharina Salz, Eva Peters und Prof. Gabriele Thumann eine sehr gute Partnerschaft trotz der Ferne aufgebaut und sehr gute Ergebnisse erzielt. Ganz besonders möchte ich Dipl. Biologin Anna Katharina Salz hervorheben. Gemeinsam haben wir in kurzer Zeit viel erreicht.

Meinen Freunden danke ich natürlich auch an dieser Stelle. Es sind vor allem Christian R. Berlet, Marco Waas, Leslie Wagner und Kathrin Schröter zu nennen. Durch sie konnte ich das *Mentale Training* und des *psychogene Atemtraining* kennen lernen, um so besser mit dem Druck umzugehen und immer einen klaren Kopf zu behalten. So konnte ich das Ziel nie aus den Augen verlieren und meine Doktorarbeit in 2 Jahren und 6 Monaten beenden.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner Familie. Meiner Mutter Lilli Walz danke ich auf das Herzlichste für die Ermöglichung des Studiums und der Doktorarbeit. Mit ihrem großen Einsatz und dem starken Glauben an mich konnte ich diese Arbeit überhaupt erst bewältigen. Weiterhin danke ich meiner Großmutter Maria Felde, die durch ihre aufbauenden Worte immer da war und mich immer unterstützt hat.